

Reference B02

Appl. No. 09/090,754
Attorney Docket No. 8449-041-999

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2000-507083

(P2000-507083A)

(43) 公表日 平成12年6月13日 (2000.6.13)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/00	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 P 35/00		A 6 1 K 31/00	6 3 5
37/00			6 3 7
A 6 1 K 38/00		39/00	H
39/00		C 0 7 K 14/47	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 65 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-509533
(86) (22) 出願日 平成8年8月16日 (1996.8.16)
(85) 翻訳文提出日 平成10年2月18日 (1998.2.18)
(86) 国際出願番号 PCT/US96/13363
(87) 国際公開番号 WO97/06821
(87) 国際公開日 平成9年2月27日 (1997.2.27)
(31) 優先権主張番号 60/002,479
(32) 優先日 平成7年8月18日 (1995.8.18)
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(31) 優先権主張番号 60/002,490
(32) 優先日 平成7年8月18日 (1995.8.18)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 スローン-ケッタリング インスティテュート
フォー キャンサー リサーチ
アメリカ合衆国 10021 ニューヨーク州
ニューヨーク, ヨーク アベニュー
1275
(72) 発明者 ロスナン, ジェームス イー.
アメリカ合衆国 10021 ニューヨーク州
ニューヨーク, イースト 64ティール
チ ストリート 402, アパートメント
10B
(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 熱ショックタンパク質に基づくワクチンおよび免疫療法

(57) 【要約】

1以上の特定された標的抗原と組み合わせた1以上の熱ショックタンパク質を有効な量で患者に投与する、患者において免疫応答を引き出すための方法および組成物に関する。これらの方法および組成物は感染性疾患並びに癌の治療に用いることができる。

【特許請求の範囲】

1. (a) 標的抗原、および

(b) 熱ショックタンパク質、

を含んでなる、患者において治療免疫応答を引き出すための組成物であって、

上記の標的抗原と熱ショックタンパク質は、熱ショックタンパク質への標的抗原の結合が起こる条件下にin vitroで組み合わせられて、標的抗原／熱ショックタンパク質複合体を形成しており、

この標的抗原／熱ショックタンパク質複合体が患者に投与されると、細胞障害性細胞成分を含む免疫応答が引き出されることを特徴とする上記組成物。

2. 熱ショックタンパク質がh s p 7 0である、請求項1に記載の組成物。

3. 熱ショックタンパク質がg p 9 6である、請求項1に記載の組成物。

4. 熱ショックタンパク質がh s p 4 0である、請求項1に記載の組成物。

5. 熱ショックタンパク質がB i Pである、請求項1に記載の組成物。

6. 標的抗原がハイブリッド抗原である、請求項1～5のいずれか1項に記載の組成物。

7. ハイブリッド抗原が第1供給源に由来する抗原性ドメインと、第1供給源とは異なる第2供給源に由来する熱ショックタンパク質と結合する結合性ドメインを含有する、請求項6に記載の組成物。

8. 結合性ドメインが次の配列：

H y X H y X H y X H y

(ここで、H yは疎水性のアミノ酸残基を表し、Xは任意のアミノ酸である)
をもつ少なくともヘプタマー領域を含むものである、請求項7に記載の組成物。

9. 結合性ドメインが次の配列：

His Trp Asp Phe Ala Trp Pro Trp (配列番号1)

をもつ領域を含むものである、請求項7に記載の組成物。

10. (a) プロモーターエレメントに機能的に連結された標的抗原をコードする領域を含有する核酸分子、および

(b) プロモーターエレメントに機能的に連結された熱ショックタンパク質

を

コードする領域を含有する核酸分子、

を含んでなる、患者において治療免疫応答を引き出すための組成物であって、

(a) および(b)の核酸が細胞に導入されると、熱ショックタンパク質への標的抗原の結合が生じることを特徴とする上記組成物。

11. (a) および(b)の核酸分子が同一のベクター中に含まれている、請求項10に記載の組成物。

12. 熱ショックタンパク質がh s p 70である、請求項10または11に記載の組成物。

13. 熱ショックタンパク質がg p 96である、請求項10または11に記載の組成物。

14. 熱ショックタンパク質がh s p 40である、請求項10または11に記載の組成物。

15. 熱ショックタンパク質がB i Pである、請求項10または11に記載の組成物。

16. 標的抗原がハイブリッド抗原である、請求項10～15のいずれか1項に記載の組成物。

17. ハイブリッド抗原が第1供給源に由来する抗原性ドメインと、第1供給源とは異なる第2供給源に由来する、熱ショックタンパク質と結合する結合性ドメインを含有する、請求項16に記載の組成物。

18. 結合性ドメインが次の配列：

H y X H y X H y X H y

(ここで、H yは疎水性のアミノ酸残基を表し、Xは任意のアミノ酸である)
をもつ少なくともヘプタマー領域を含むものである、請求項17に記載の組成物。

19. 結合性ドメインが次の配列：

His Trp Asp Phe Ala Trp Pro Trp (配列番号1)

をもつ領域を含むものである、請求項17に記載の組成物。

20. 免疫応答の誘導を必要としている患者において免疫応答を引き出す方法であ

って、治療に有効な量の請求項1～19のいずれか1項に記載の組成物を該患者に投与することを含んでなる方法。

21. (a) 第1供給源に由来する抗原性ドメイン、および

(b) 第1供給源とは異なる第2供給源に由来する、熱ショックタンパク質と結合する結合性ドメイン、
を含んでなるハイブリッドペプチド。

22. 抗原性ドメインがウイルス、寄生生物、マイコプラズマ、真菌または細菌に由来するものである、請求項21に記載のハイブリッドペプチド。

23. 抗原性ドメインが新生物疾患に対する免疫応答を引き出すものである、請求項21または22に記載のハイブリッドペプチド。

24. 新生物疾患が肉腫、リンパ腫、癌腫、白血病およびメラノーマの中から選択される、請求項23に記載のハイブリッドペプチド。

25. 結合性ドメインが次の配列：

Hy XHy XHy XHy

(ここで、Hyは疎水性のアミノ酸残基を表し、Xは任意のアミノ酸である)
をもつ少なくともヘプタマー領域を含むものである、請求項21～24のいずれか1項に記載のハイブリッドペプチド。

26. 結合性ドメインが次の配列：

His Trp Asp Phe Ala Trp Pro Trp (配列番号1)

をもつ領域を含むものである、請求項21～24のいずれか1項に記載のハイブリッドペプチド。

27. 結合性ドメインが次の配列：

Gln Lys Arg Ala Ala (配列番号5) および

Arg Arg Arg Ala Ala (配列番号6)

の中から選択される少なくともペンタペプチド領域を含むものである、請求項21～24のいずれか1項に記載のハイブリッドペプチド。

28. (a) 第1供給源に由来する抗原性ドメインと、第1供給源とは異なる第2

供給源に由来する、熱ショックタンパク質と結合する結合性ドメインと、を含む
有するハイブリッドペプチドをコードする領域、

(b) 哺乳動物細胞において上記のハイブリッドペプチドの発現を促すのに
効果的なプロモーター、
を含んでなるポリヌクレオチド構築物。

29. 抗原性ドメインがウイルス、寄生生物、マイコプラズマ、真菌または細菌に
由来するものである、請求項28に記載のポリヌクレオチド構築物。

30. 抗原性ドメインが新生物疾患に対する免疫応答を引き出すものである、請求
項28に記載のポリヌクレオチド構築物。

31. 新生物疾患が肉腫、リンパ腫、癌腫、白血病およびメラノーマの中から選択
される、請求項30に記載のポリヌクレオチド構築物。

32. 結合性ドメインが次の配列：

Hy XHy XHy XHy

(ここで、Hyは疎水性のアミノ酸残基を表し、Xは任意のアミノ酸である)
をもつ少なくともヘプタマー領域を含むものである、請求項28～31のいず
れか1項に記載のポリヌクレオチド構築物。

33. 結合性ドメインが次の配列：

His Trp Asp Phe Ala Trp Pro Trp (配列番号1)

をもつ領域を含むものである、請求項28～31のいずれか1項に記載のポリ
ヌクレオチド構築物。

34. 結合性ドメインが次の配列：

Gln Lys Arg Ala Ala (配列番号5) および

Arg Arg Arg Ala Ala (配列番号6)

の中から選択される少なくともペンタペプチド領域を含むものである、請求項
28～31のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【発明の詳細な説明】

熱ショックタンパク質に基づくワクチンおよび免疫療法

ここに記載する発明はNIH Core Grant No. CA 08748のもとでの研究の過程で行われたものである。米国政府はこの発明に対していくらかの権利を有する。

序

本発明は、有効量の1以上の特定された標的抗原と組み合わせた1以上の熱ショックタンパク質を患者に投与する、患者において免疫応答を引き出すための方法および組成物に関する。これらの方法および組成物は感染性疾患および癌の治療に用いることができる。

発明の背景

熱ショックタンパク質が最初に観察されたのは、突然の温度上昇にさらされた哺乳動物細胞において、大部分の細胞性タンパク質の発現が顕著に低下するのに対し、増加量で発現されるタンパク質としてであった。以来、この種のタンパク質はグルコース欠乏を含めて様々なタイプのストレスに応答して産生されることが判明した。本明細書中で用いる「熱ショックタンパク質」という用語は、文字どおりにそのまま呼ばれるタンパク質と、構成的に（すなわち、ストレス条件の不在下で）発現されるこの種のタンパク質の相同体を含めた他のストレスタンパク質との両方を包含するものである。熱ショックタンパク質の例としては、BiP (grp78ともいう)、hsp/hsc70、gp96 (grp94)、hsp60、hsp40およびhsp90がある。

熱ショックタンパク質は非天然状態の他のタンパク質と結合することができ、特にリボソームから合成されたばかりの、または小胞体に押し出された未成熟なペプチドと結合することができる (Hendrick and Hartl., Ann. Rev. Biochem. 62:349-384(1993); Hartl., Nature 381:571-580(1996))。さらに、熱ショックタンパク質は細胞質ゾル、小胞体およびミトコンドリアでのタンパク質の正しい折りたたみ (フォールディング) および集合 (アセンブリ) において重要な役

割を担っていることがわかった。こうした機能を考慮して、それらは「分子シャペロン」 (molecular chaperone) と称される (Frydmanら, Nature 370:111-117(1

994);Hendrick and Hartl., Ann. Rev. Biochem. 62:349-384(1993);Hartl, Nature 381:571-580(1996))。

例えば、h s p 7 0ファミリーと呼ばれる熱ショックタンパク質のクラスのメンバーであるタンパク質B i Pは、小胞体でのL鎖とH鎖の集合に先立って、合成されたばかりの、折りたたまれていない μ 免疫グロブリンH鎖と結合することが見いだされた(Hendershotら, J. Cell Biol. 104:761-767(1987))。もう一つの熱ショックタンパク質g p 9 6は、小胞体に集まるストレスタンパク質のh s p 9 0ファミリーのメンバーである(Li and Srivastava, EMBO J. 12:3143-3151(1993);Mazzarella and Green, J. Biol. Chem. 262:8875-8883(1987))。g p 9 6は小胞体での多サブユニットタンパク質の集合の手助けをしていると提唱された(Wiechら, Nature 358:169-170(1992))。

実験動物において腫瘍から調製された熱ショックタンパク質は、腫瘍特異的に免疫応答を引き出せることが観測された。すなわち、特定の腫瘍から精製された熱ショックタンパク質は、実験動物において同腫瘍の増殖を抑えるが、他の腫瘍の増殖は抑制しない免疫応答を引き出すことができた(Srivastava and Maki, 1991, Curr. Topics Microbiol. 167:109-123)。腫瘍特異的免疫原性の起源は確認されていない。熱ショックタンパク質をコードする遺伝子が腫瘍特異的DNA多型を示すことはわかっていない(Srivastava and Udono, Curr. Opin. Immunol. 6:728-732(1994))。高分解能のゲル電気泳動から、g p 9 6は分子レベルで不均一でありうることが示された(Feldweg and Srivastava, Int. J. Cancer 63:310-314(1995))。不均一性のソースは熱ショックタンパク質に付着している小型のペプチドの集団であって、その数は数百に達するとされた(同上)。腫瘍により合成された熱ショックタンパク質に付着しているペプチドの多様性により、このタンパク質は様々なHLA表現型をもつ患者において免疫応答を引き出すことができるが、これに対し、より伝統的な免疫原はその効力の点でいくらかHLA制限される可能性があるかと推察された(同上)。

最近、Nielandら(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:6135-6139(1996))は、

水疱性口内炎ウイルス(VSV)に感染した細胞により産生された、g p 9 6に

結合した細胞障害性Tリンパ球（CTL）VSVエピトープを含有する抗原性ペプチドを同定した。Nielandの方法は、同様にgp96に結合していたかもしれない別のペプチドや他の化合物の同定を阻むものであった。それゆえ、この方法は、gp96に結合していて、高圧液体クロマトグラフィーにより検出される、より高分子量の物質をさらに特性づけることができなかった。

グルタルアルデヒドで固定したマイコバクテリアhsp65またはhsp70に化学架橋された、NANP (Asp Ala Asp Pro)の多重反復配列を含む合成ペプチドは、アジュバントを添加しなくても、マウスにおいて抗体産生（すなわち、体液性免疫）を引き出すことができたと報じられた。同様の結果が大腸菌由来の熱ショックタンパク質を用いたときにも観察された（Del Giudice, *Experientia* 50:1061-1066(1994); Barriosら, *Clin. Exp. Immunol.* 98:224-228(1994); Barriosら, *Eur. J. Immunol.* 22:1365-1372(1992)）。抗体の誘導には、合成ペプチドの熱ショックタンパク質への架橋と、おそらくグルタルアルデヒド固定が必要であるとされた（Barriosら, *Clin. Exp. Immunol.* 98:229-233）。

今回、本発明により、熱ショックタンパク質を標的抗原と組み合わせて使用すると、細胞障害性細胞成分を含む免疫応答、すなわち細胞性応答を引き出し得ることが見いだされた。

発明の概要

本発明は、1以上の特定された標的抗原と組み合わせた1以上の熱ショックタンパク質を患者に投与する、患者において免疫応答を引き出すための方法および組成物に関する。

免疫原としての効果が単一の腫瘍に限定されていた潜在的抗原の不特定集団と結合された熱ショックタンパク質に関する従来の開示とは相違して、本発明は、熱ショックタンパク質を特定された標的抗原（該抗原は様々な新生物疾患または感染性疾患の症例において免疫原性があるという点で選択されるか、または個々の場合に特に免疫原性があると確認されているために選択される）と組み合わせる方法および組成物を提供する。さらに、1以上の特定された標的抗原を使用す

ると、誘起される免疫応答を制御しやすくなるので、望ましくない免疫応答が引

き出されるのを避けることができる。

本発明の別の実施態様において、標的抗原は(i)抗原自体が熱ショックタンパク質と結合する抗原、または(ii)免疫原性ドメインと熱ショックタンパク質結合性ドメインとを含むハイブリッド抗原、のいずれかであり得る。免疫原性ドメインはタンパク質またはペプチド抗原の全体であっても、所定の抗原の一部だけ（例えば、抗原の所定のエピトープ）であってもよい。本発明の特定の非限定的実施態様において、熱ショックタンパク質結合性ドメインは次の配列：

His Trp Asp Phe Ala Trp Pro Trp (配列番号1)

をもつペプチドを含むことができる。

本発明はこのような熱ショックタンパク質／標的抗原組成物を投与する方法を提供し、この方法は(i)標的抗原の熱ショックタンパク質への結合が起こる条件下で1以上の熱ショックタンパク質を1以上の標的抗原とin vitroで組み合わせて標的抗原／熱ショックタンパク質複合体を形成し、そして(ii)かかる治療を必要としている患者に熱ショックタンパク質に結合された標的抗原を有効な量で投与することを含んでなる。

あるいはまた、本発明の熱ショックタンパク質／標的抗原組合せ物は、標的抗原と熱ショックタンパク質がin situで結合するように、標的抗原および熱ショックタンパク質をコードする核酸を患者に導入することにより、患者に投与することもできる。

図面の簡単な説明

図1は、本発明によるハイブリッドペプチド抗原を用いたときの細胞性免疫応答の誘導を示す。

図2は、本発明によるハイブリッドペプチド抗原を用いたときの細胞性免疫応答の誘導を示す。

図3は、本発明によるハイブリッドペプチド抗原を用いたときの細胞性免疫応答の誘導を示す。

図4は、本発明によるハイブリッドペプチド抗原を用いたときの細胞性免疫応答の誘導を示す。

図5 Aおよび5 Bは、ハイブリッドペプチドまたはO v a -ペプチドおよび熱ショックタンパク質をE L 4細胞に個々に投与した対照実験の結果を示す。

図6は、ハイブリッドペプチドの熱ショックタンパク質への結合を実証する、カラムからのハイブリッドペプチドと熱ショックタンパク質の同時溶出を示す。

図7は、ATPの存在下および不在下での¹²⁵I-OVA-B i PとB i Pとの同時溶出を示す。

図8は、抗原と熱ショックタンパク質の種々の組合せ物で感作したT細胞の、抗原パルスしたE L 4細胞に対する溶菌効力を示す。

図9は、様々な濃度の抗原と熱ショックタンパク質で感作したT細胞の、E G 7リンパ腫細胞に対する溶菌効力を示す。

発明の詳細な説明

説明を明確にするため（限定するためではない）、詳細な説明を次のように分割する：

- (i) 熱ショックタンパク質、
- (ii) 標的抗原、および
- (iii) 投与方法。

熱ショックタンパク質

本明細書中で用いる「熱ショックタンパク質」という用語は、細胞がストレスにさらされると細胞内での発現が増加するタンパク質を意味する。好ましい非限定的実施態様において、熱ショックタンパク質は真核細胞に由来するものであり、より好ましい実施態様では、熱ショックタンパク質は哺乳動物細胞に由来するものである。例えば、限定するものではないが、本発明に従って用いられる熱ショックタンパク質としては、B i P（g r p 7 8ともいう）、h s p / h s c 7 0、g p 9 6（g r p 9 4）、h s p 6 0、h s p 4 0およびh s p 9 0がある。特に好ましい熱ショックタンパク質は以下に例示するようなB i P、g p 9 6およびh s p 7 0である。熱ショックタンパク質の天然に存在する変異体また

は組換え的に誘導された変異体も本発明に従って用いることができる。例えば、限定するものではないが、本発明は、細胞からの分泌を促進するように突然変異

させた（例えば、KDELまたはその相同体のような、小胞体再捕捉を促進するエレメントの突然変異または欠失をもつ）熱ショックタンパク質の使用を提供する。この種の変異体は同時に出願されたPCT出願第_____号（代理人文書番号MSK.P-018）に記載されており、それを参考としてここに組み入れるものとする。

熱ショックタンパク質と標的抗原がタンパク質／ペプチド複合体の形で患者に直接投与される本発明の実施態様では、熱ショックタンパク質は、例えばFlynnら、Science 245:385-390(1989)に記載されるように、天然源から標準的手法を用いて調製することができるし、細菌、酵母、哺乳動物細胞などの適当な宿主細胞において熱ショックタンパク質コード化ベクターを発現させるといった組換え法を用いて調製することもできる。宿主生物由来のペプチドによる熱ショックタンパク質のプレローディング(pre-loading)が心配な場合は、その熱ショックタンパク質をATPとともにインキュベートし、その後再精製することができる。組換え体熱ショックタンパク質の調製方法の非限定的例を以下で説明する。

熱ショックタンパク質をコードする核酸を、発現に必要なまたは望ましいエレメントと機能的に連結させ、その後、これをタンパク質ワクチンで使用する熱ショックタンパク質を生産する手段として使用するか、あるいはまた、核酸ワクチンにおいて所望の熱ショックタンパク質を発現させるために使用する。発現に必要なまたは望ましいエレメントとしては、プロモーター／エンハンサーエレメント、転写開始および終止配列、ポリアデニル化シグナル、翻訳開始および終止配列、リボソーム結合部位、シグナル配列などがあり、これらに限らない。例えば、各種の熱ショックタンパク質の遺伝子がクローニングされ、配列決定されている。それらには、g p 9 6、ヒト:Genebank受入れ番号X15187;Makiら、Proc. Nat'l Acad. Sci. 87:5658-5562(1990)、マウス:Genebank受入れ番号M16370;Srivastavaら、Proc. Nat'l Acad. Sci. 84:3807-3811(1987);B i P、マウス:Genebank受入れ番号U16277;Haasら、Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 85:2250-2254(1988)、ヒト:Genebank受入れ番号M19645;Tingら、DNA 7:

275-286(1988);h s p 7 0、マウス:Genebank受入れ番号M35021;Huntら、Gene 8

7:199-204(1990)、ヒト:Genebank受入れ番号M24743;Huntら, Proc.Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 82:6455-6489(1995);およびh s p 4 0、ヒト:Genebank受入れ番号D49547;OhtsukaK., Biochem Biophys. Res. Commun.197:235-240 (1993) があるが、これらに限らない。

標的抗原

本発明による標的抗原は、(i)抗原自体が熱ショックタンパク質と結合する抗原、または(ii)免疫原性ドメインと熱ショックタンパク質結合性ドメインとを含むハイブリッド抗原、のいずれかであり得る。こうして、標的抗原は少なくとも2つの機能を果たす。すなわち、(I)標的抗原は所望の免疫応答を引き出すことができるエピトープを含有する、そして(II)標的抗原はそのパートナーである熱ショックタンパク質と物理的に結合することができる。ここで、「物理的に結合する」とは、標的抗原と熱ショックタンパク質が少なくとも一時的に互いの接着を可能とする物理的相互作用を示すことを指す。この結合は不可逆的である必要はなく、本発明のほとんどの実施態様では、可逆的であるべきである。

いくつかの実施態様において、所望の免疫応答を引き出すことができる抗原は、パートナーである熱ショックタンパク質との結合能を生来もっているものである。他の実施態様では、免疫原性ドメインと熱ショックタンパク質結合性ドメインの両方を含有するハイブリッド抗原を作製するために、免疫原性のある抗原を1以上の他の化合物に結合させることが必要であるか、またはそうすることが望ましい。このような場合には、それ自体が免疫原性のある抗原である化合物を、それ自体が熱ショックタンパク質との結合能を有する化合物に結合させればよい。あるいはまた、個々にはいずれの機能も欠失している2以上の化合物の結合が、所望の免疫原性と結合性の特性を生み出す可能性もある。

本明細書中で用いる「抗原」とは、個々にまたは任意の組合せで、アミノ酸、炭水化物、核酸または脂質から構成される化合物のことである。

本明細書中で用いる「標的抗原」とは、1以上の熱ショックタンパク質に結合し、かつ所望の免疫応答を引き出すことができる免疫原を代表する化合物のこと

である。例えば、免疫原がインフルエンザウイルスである場合、標的抗原はイン

フルエンザウイルスのマトリックスタンパク質のペプチド断片であり得る。本明細書中で用いる「免疫原」という用語は、免疫応答が誘起されるはずの新生物細胞、感染細胞、病原体またはその構成成分に適用され、一方、標的抗原は、所望の応答を引き出すことができ、しかも固有の性質としてまたは工学的操作により1以上の熱ショックタンパク質と結合する前記免疫原の一部分のことである。特に、標的抗原は、MHC分子由来のペプチド、変異DNA遺伝子産物、腫瘍細胞に由来するような直接的DNA産物を含めて、特定の疾病または病原体に対して免疫応答を引き出すように選択される。

本発明はどのようなタイプの免疫原にも応用できるが、特に興味のもてる免疫原は、肉腫、リンパ腫、白血病または癌腫、特にメラノーマ、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、大腸癌、肺癌、グリア芽細胞腫、神経膠星状細胞腫などを含むがこれらに限らない、新生物疾患と関係があるもの、かかる新生物疾患に由来するもの、またはかかる新生物疾患と関係があると予想されるものである。さらに、p53のような腫瘍抑制遺伝子産物の突然変異体、またはラス (ras) のような癌遺伝子産物も本発明に従って用いられる標的抗原を提供する。

別の実施態様では、免疫原は感染症と関係があるものであり、そのようなものは細菌、ウイルス、原生動物、マイコプラズマ、真菌、酵母、寄生物またはプリオンであり得る。例えば、限定するものではないが、免疫原はヒト乳頭腫ウイルス（下記参照）、単純ヘルペスや帯状疱疹のようなヘルペスウイルス、ヒト免疫不全ウイルス1または2のようなレトロウイルス、肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、リノウイルス、呼吸シんシチアルウイルス、サイトメガロウイルス、アデノウイルス、肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*)、サルモネラ属、スタフィロコッカス属、ストレプトコッカス属、エンテロコッカス属、クロストリジウム属、エシェリキア属、クレブシエラ属、ビブリオ属、マイコバクテリウム属、アメーバ、マラリア寄生虫、トリパノソーマ・クルーズ (*Trypanosoma cruzi*) などである。

免疫原は新生物、感染細胞、感染者からの検体、細胞培養物または生物培養物から直接単離することにより得られるが、化学的方法もしくは組換え法により合

成することもできる。ウイルスや細菌などに対して、特にハイブリッド抗原として、使用するのに適した抗原ペプチドは、次のHLA-A2ペプチド結合配列：

Xaa(Leu/Met)XaaXaaXaa(Val/Ile/Leu/Thr)XaaXaa(Val/Leu) (配列番号2)

Rammenseeら, Immunogenetics 41:178-223 (1995)

Xaa(Leu/Met)XaaXaaXaaXaaXaaXaaVal (配列番号3)

Tarpeyら, Immunology 81:222-227 (1994)

Xaa(Val/Gln)XaaXaaXaaXaaXaaXaaLeu (配列番号28)

Barouchら, J. Exp. Med. 182:1847-1856 (1995)

のような（しかし、これらに限らない）HLA結合配列を含有するMHCクラスI制限ペプチドエピトープをそれらの配列から検索することで設計することができる。

また、希望する免疫応答のタイプを考慮に入れることが望ましいかもしれない。例えば、ある状況のもとでは、体液性免疫応答が妥当である。他の場合、特に、新生物細胞や感染細胞に対する免疫応答を引き出そうとする場合は、細胞性免疫応答が特に望ましいものである。したがって、標的抗原に組み込むために、B細胞、Tヘルパー細胞または細胞障害性T細胞の活性化と関連した特定のエピトープを同定し選択することができる。

また、自己免疫疾患やアレルギーと関連した標的抗原を利用することが望ましいことがある。このような標的抗原を、患者において寛容原性をもたらすのに十分な量で、または標的抗原に対する既存の免疫応答を抑制するのに十分な量で、1以上の熱ショックタンパク質とともに投与することができる。免疫応答を抑制するのに必要な熱ショックタンパク質の量は、刺激に必要とされる量よりも実質的に多くなると予想される。

標的抗原のサイズは用いる熱ショックタンパク質に応じて様々であるが、本発明の非限定的実施態様では、標的抗原は4～500個のアミノ酸残基を有するペプチドの大きさ、好ましくは4～100個、最も好ましくは7～20個のアミノ酸残基を有するペプチドの大きさでありうる。そのような標的抗原として利用するために免疫原の断片を作製したり、あるいは化学的または組換えDNA法により標的抗原を合成することが望ましいだろう。しかし、いくつかの場合には、免

疫原を完全な形で標的抗原として利用してもよい。

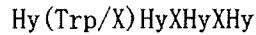
前記の考慮すべき事項に基づいて標的抗原を調製し、その後熱ショックタンパク質との結合能について試験する。ある場合に、特定の熱ショックタンパク質への標的抗原の結合は少なくとも1つの他のタンパク質（熱ショックタンパク質であつてもよい）の存在により促進されることがある。

例えば、熱ショックタンパク質への標的抗原の結合を評価するには、放射能、蛍光、酵素または色素のような検出可能な標識で標的抗原を標識し、結合を起こさせると予想される条件下で該標的抗原を熱ショックタンパク質と一緒に合わせ、その後未結合の標的抗原を除去しつつ熱ショックタンパク質を単離し、そして標識した標的抗原が熱ショックタンパク質に結合したか否かを調べる。特定の例として、限定するものではないが、BiP熱ショックタンパク質への標的抗原の結合能を評価するにあたり、2 μ gのBiPと約1150pmoleまでの放射性標識した標的抗原とを、50mM Tris-HCl (pH7.5), 200mM NaClおよび1mM Na₂EDTAを含有する緩衝液中で、最終容量50 μ lにて、37°Cで30分間一緒にする。次に、100xgで遠心し、1ml Sephadex-Gカラムに2分間通して脱塩することにより、結合したBiP-標的抗原から未結合の標的抗原を除去する (Penefsky, J. Biol. Chem. 252: 2891(1977))。樹脂への結合を防ぐために、最初にカラムを同一緩衝液中の100 μ lのウシ血清アルブミンで処理してから上記のように遠心する。その後、結合した標的抗原を液体シンチレーション計測により定量する (Flynnら, Science 245:385-390(1989)を参照のこと)。

ATP加水分解は多くの既知の熱ショックタンパク質からペプチドを放出させるので、しばしば、熱ショックタンパク質への標的抗原の結合量を定量するためにATPアーゼ活性の量が用いられる。こうしたアッセイをどのように行うかの一例が、Flynnら, Science 245:385-390(1990)に記載されている。

特定の免疫原またはその断片が満足のゆく程度に熱ショックタンパク質に結合しない場合は、熱ショックタンパク質結合性ドメインを導入するように別の化合物にその免疫原または断片を結合させ、これによりハイブリッド抗原を構築することができる。熱ショックタンパク質結合性ドメインは、ハイブリッドペプチドがin vitroでBiP、hsp70、gp96、hsp90などの熱ショックタン

パク質と（単独で、またはh s p 4 0、h s p 6 0などの補助熱ショックタンパク質との組み合わせで）結合するように選択される。この基準を満たすペプチドは、Blond-Elguindiら、Cell 75:717-728(1993)に記載されるような、1以上の熱ショックタンパク質によく結合することが知られた抗原のライブラリーをパニングすることで同定できる。この技法を使って、Blond-Elguindiは、熱ショックタンパク質B i Pが次の配列：



（ここで、Hyは疎水性アミノ酸残基、特にトリプトファン、ロイシンまたはフェニルアラニンを表し、Xは任意のアミノ酸である）を有するヘプタマー領域を含むポリペプチドを認識すると結論づけている。このモチーフを含有する高親和性の熱ショックタンパク質結合性配列としては次のものがある。

His Trp Asp Phe Ala Trp Pro Trp (配列番号1) および

Phe Trp Gly Leu Trp Pro Trp Glu (配列番号4)

その他の熱ショックタンパク質結合性モチーフも同定されている。例えば、Augerら (Nature Medicine 2:306-310(1996)) は、熱ショックタンパク質と結合する慢性関節リウマチに関連したHLA-DR型において次の2つのペプチド結合性モチーフを同定した。

Gln Lys Arg Ala Ala (配列番号5) および

Arg Arg Arg Ala Ala (配列番号6)

また、熱ショックタンパク質結合性モチーフは、疎水性アミノ酸に富む7～15残基長のペプチドからなるものであると確認されている (Flynnら、Science 245:385-390(1989); Gragerovら、J. Molec. Biol. 235:848-854(1994))。

本発明のハイブリッド抗原は、1つの免疫原性ドメインと1つの熱ショックタンパク質結合性ドメインを、場合により短いペプチドリンカーにより分離された状態で、含有する。本発明のハイブリッドペプチドは化学的ペプチド合成法で合成しても、抗原性ドメインと熱ショックタンパク質結合性ドメインをコードする連結配列を含有する核酸構築物の発現により合成してもよい。1つの適当な技法は、最初にPCR増幅反応を別々に行って2つのドメインをコードする別個のDNAセグメント（それぞれが一端に結合されたリンカーセグメントを有する）を

作製し、続いて別のPCR工程で2つの増幅産物を融合させるというものである。この技法はリンカーテイリング(linker tailing)と呼ばれている。関心のある領域に適当な制限部位を遺伝子操作により導入し、その後制限酵素消化とライゲーションを行って目的のハイブリッドペプチドコード配列を得ることもできる。

投与方法

本発明の熱ショックタンパク質／標的抗原組合せ物は、患者において治療免疫応答を引き出すのに有効な量の熱ショックタンパク質／標的抗原複合体を生じるように、タンパク質系ワクチンまたは核酸ワクチンのいずれかを用いて患者に投与される。

この患者はヒトであってもヒト以外であってもよい。

本明細書中で用いる「治療免疫応答」とは、標的抗原に対して誘導される、標準的な技法により測定したときの体液性および／または細胞性免疫の増加をいう。好ましくは、限定するものではないが、標的抗原に対して誘導される体液性免疫の誘導レベルは、患者に本発明の組成物を投与する前に標的抗原に対して誘導された体液性免疫のレベルの4倍以上、より好ましくは16倍以上である。免疫応答を定性的に測定することもでき、その場合は、適当なin vitroアッセイを用いてまたはin vivoにおいて、患者の新生物疾患または感染症の進行が止まることもしくは快方に向かうことが治療免疫応答の誘導の指標となると考えられる。

熱ショックタンパク質／標的抗原の特定の投与量は、個々のワクチン組成物の免疫原性、患者の免疫適格性、患者の体重、投与経路を含めて、様々な要因に左右される。所定の組成物の適切な投与量を決定することはルーチンなスクリーニングの問題である。

本発明の特定の非限定的実施態様において、免疫応答を最適化するために、1種より多い熱ショックタンパク質および／または1種より多い標的抗原を含むことが好ましい場合がある。こうしたアプローチは特に癌の治療や速やかな突然変異の発生（結果的に免疫応答を回避するようになる）により特徴づけられる感染症の治療に有利である。

本発明のその他の特定の非限定的実施態様では、それぞれの熱ショックタンパ

ク質／標的抗原ペアのメンバー同士の結合を促進するために、熱ショックタンパク質と標的抗原の比を1：2から1：200とすることが好ましい。抗原のより高い相対レベルが熱ショックタンパク質への結合を高めるうえで適している。

本発明の更なる特定の非限定的実施態様によれば、標的抗原は熱ショックタンパク質に化学的に架橋されることがない。

本明細書中では上記のような標的抗原／熱ショックタンパク質を含有する組成物を「ワクチン」という。「ワクチン」という用語を使用するのは、本発明の組成物が治療免疫応答を引き出すために用いられることを示すためである。

本発明による1以上の熱ショックタンパク質および1以上の標的抗原を含有するワクチン組成物は、皮膚、皮下、静脈内、筋肉内、腸管外、肺内、膈内、直腸内、鼻腔内または局所に投与することができる。ワクチン組成物を注入、パーティクルボンバードメント (particle bombardment)、経口またはエアロゾルにより投与してもよい。

たいいていの場合、熱ショックタンパク質への標的抗原のローディング (loading) を達成するには、溶液中で熱ショックタンパク質を該抗原とインキュベートすることで十分である。しかし、抗原のローディングを支援することができる作用物質を添加することが好ましい場合もある。

熱ショックタンパク質と標的抗原とを加熱しながらインキュベートすると、一般に、熱ショックタンパク質への該抗原のローディングが達成される。しかし、いくつかの場合には、このローディングを助ける追加の作用物質を添加することが望ましい。例えば、hsp40はhsp70へのペプチドのローディングを促進することができる (Minamiら, Gen. Biol. Chem. 271:19617-19624 (1996))。グアニジニウム塩酸や尿素のような変性剤を用いて熱ショックタンパク質を部分的にかつ可逆的に脱安定化させると、ペプチド結合ポケットが該抗原に接近しやすくなる。

本発明によるワクチン組成物はさらに、製剤学上許容される担体のような種々の追加の物質を含んでいてもよい。適当な担体としては、リン酸緩衝化食塩水、水、エマルジョン (例えば、油／水エマルジョンまたはトリグリセリドエマルジョン)、種々のタイプの湿潤剤、錠剤、コーティング錠、カプセルといった製剤

学上許容された標準的な担体がある。化合物の静脈内および腹腔内投与に適した許容されるトリグリセリドエマルジョンの例は、Intralipid®という商標名で販

売されているものである。典型的には、この種の担体はデンプン、ミルク、糖、いくつかのタイプのクレー、ゼラチン、ステアリン酸、タルク、植物性の油脂、ガム、グリコールなどの賦形剤または他の公知の賦形剤を含む。また、このような担体にはフレーバーや着色剤、または他の成分が含まれていてもよい。

本発明のワクチン組成物はまた、適当な希釈剤、防腐剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバントおよび／または担体を含むことができる。このような組成物は液体形態であっても、凍結乾燥または他の方法で乾燥した製剤であってもよく、種々の緩衝液組成（例：Tris-HCl、酢酸塩、リン酸塩）、pHおよびイオン強度の希釈剤、表面への吸着を防止するアルブミンやゼラチンのような添加剤、界面活性剤（例：トウイーン20、トウイーン80、プルロニックF68、胆汁酸塩）、可溶化剤（例：グリセロール、ポリエチレングリセロール）、酸化防止剤（例：アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）、防腐剤（例：チメロサル、ベンジルアルコール、パラベン）、バルキング物質または張度調整剤（例：ラクトース、マンニトール）、タンパク質へのポリエチレングリコールのようなポリマーの共有結合、金属イオンとの錯生成、またはポリ乳酸、ポリグリコール酸、ヒドロゲルなどのポリマー化合物の粒状物の内部または表面への、もしくはリポソーム、微小エマルジョン、ミセル、単ラメラまたは多ラメラ小胞、赤血球ゴースト、またはスフェロプラストへの該物質の取り込みを含むことができる。かかる組成物は物理的状態、溶解度、安定性、in vivo放出速度、およびin vivoクリアランス速度に影響を与えうる。組成物の選択はワクチンの物理的・化学的性質によるだろう。例えば、膜結合型のタンパク質から得られる製品は界面活性剤を含有する配合物を必要とすることがある。制御放出または持続放出組成物としては親油性デポー（例：脂肪酸、ワックス、オイル）製剤が含まれる。また、ポリマー（例：ポロキサマーまたはポロキサミン）をコーティングし、かつ組織特異的受容体、リガンドまたは抗原に対する抗体に結合させた、あるいは組織特異的受容体のリガンドに結合させた粒状組成物も本発明に包含される。本発明の組成物の他の実

施態様は、保護コーティング、プロテアーゼ阻害剤、または筋肉内、腸管外、

肺内、鼻腔内、経口を含めた様々な投与経路用の浸透増強剤を包含する。

熱ショックタンパク質と標的抗原の直接投与の代替法として、熱ショックタンパク質と標的抗原を発現可能な形態でコードする1以上のポリヌクレオチド構築物を投与することができる。ex vivoまたはin vivo法を使って、患者の細胞内にこの発現可能なポリヌクレオチド構築物を導入する。適当な方法としては、組織および腫瘍への直接注入、リポソームを用いるトランスフェクション (Fraleighら, Nature 370:111-117(1980))、受容体媒介エンドサイトーシス (Zatlowkaら, Ann. NY Acad. Sci. 660:136-153(1992))、パーティクルボンバードメント媒介遺伝子移入 (Eisenbraunら, DNA & Cell Biol. 12:792-797(1993))、ペプチド提示バクテリオファージを用いるトランスフェクションなどがある (Barryら, Nature Medicine 2:299-305(1996))。また、ポリヌクレオチドワクチンをin vitroで適切な細胞に導入してから、その細胞を患者に導入することもできる。

発現可能なポリヌクレオチドを構築するためには、熱ショックタンパク質および/または標的抗原をコードする領域を上記のように作製し、この領域をSV40プロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターまたはラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーターのような適当なプロモーターに機能的に連結させて哺乳動物発現ベクターに挿入する。その後、得られたワクチンを遺伝子免疫感作用のワクチンとして使用する。また、核酸ポリマーをウイルスベクターにクローニングすることもできる。適当なベクターとして、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ボックスウイルスベクター、アデノウイルス関連ベクターが挙げられるが、これらに限らない。本発明において使用するのに適した特定のベクターはpCDNA3 (In-Vitrogen)、プラスミドAH5 (SV40起点とアデノウイルス主要後期プロモーターを含む)、pRC/CMV (In-Vitrogen)、pCMU II (Paaboら, EMBO J. 5:1921-1927(1986))、pZip-NeoSV (Cepkoら, Cell 37:1053-1062(1984)) およびpSR α (DNAX, Palo Alto, CA)である。

実施例 1ハイブリッドペプチドの調製

トリペプチド・リンカー (gly-ser-gly) を挟んで隔てられた B i P 結合性ドメイン (His-Trp-Asp-Phe-Ala-Trp-Pro-Trp ; 配列番号 1) と O V A 抗原性ドメイン (Ser-Ile-Ile-Asn-Phe-Glu-Lys-Leu ; 配列番号 7) とを含有するハイブリッドペプチドを合成した。ペプチドは、O V A-B i P 結合性ドメインおよび B i P 結合性ドメイン-O V A の両方向から以下のように作製した。

**Ser-Ile-Ile-Asn-Phe-Glu-Lys-Leu-Gly-Ser-Gly-His-Trp-Asp-Phe-
Ala-Trp-Pro-Trp** [配列番号 8]

**His-Trp-Asp-Phe-Ala-Trp-Pro-Trp-Gly-Ser-Gly-Ser-Ile-Ile-Asn-
Phe-Glu-Lys-Leu** [配列番号 9]

実施例 2

精製したマウス細胞質ゾル h s p 7 0 を、マウス細胞質ゾル h s p 7 0 をコードする p M S 2 3 6 で形質転換した大腸菌 DH 5 α 細胞から調製した。これらの細胞を光学密度 (600nm) が 0.6 になるまで 37°C で増殖させ、IPTG を最終濃度が 1 mM になるまで添加することによって発現を誘導した。誘導の 2 ~ 5 時間後に遠心分離によって細胞を回収し、ペレットを緩衝液 A (20mM Hepes pH7.0、25mM KCl、1mM DTT、10mM (NH₄)₂SO₄、1mM PMSF) で再懸濁して 20ml にした。これらの細胞をフレンチプレスに 3 回通過させることによって溶解した。溶解物は、低速スピンのかけ、続いて 100,000xG で 30 分間にわたる遠心分離にかけることによって清澄化した。清澄になった溶解物を、100ml の DEAE Sephacel を充填しかつ緩衝液 A で平衡化した Pharmacia XK26 カラムに、0.6cm/分の流速でかけた。このカラムを安定なベースラインが得られるまで緩衝液 A で洗浄し、KCl が 174mM となるように調整した緩衝液 A で溶出した。溶出物を 25ml ATP-アガロースカラム (Sigma A2767) にのせ、緩衝液 A でベースラインに達するまで洗浄し、1mM MgATP を含有する緩衝液 A (pH7.0 に前調整しておいたもの) で溶出した。EDTA を最終濃度が 2mM

になるまでその溶出物に添加した。本質的に純粋なh s p 7 0を含有するこの溶出物を、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を80%飽和まで添加することによって沈殿させた。沈殿物を、1mM MgCl_2 を含有する緩衝液Aに再懸濁し、同じ緩衝液で何度も交換しながら透析を行った。精製したh s p 7 0を少量のアリコートに分けて -70°C で凍結した。

実施例3

この精製h s p 7 0を上記の合成ペプチドと組合せて免疫に用いた。h s p 7 0／ペプチド混合物をつくるために、約 $15\mu\text{g}$ ($21.5\mu\text{M}$)のh s p 7 0を $5\mu\text{g}$ のO v a -ペプチド (0.5mM、配列番号5) または $10\mu\text{g}$ (0.5mM)のハイブリッドペプチド (配列番号6および7) と合わせ、氷上で緩衝液B (最終濃度: 20mM Heps pH7.0、150mM KCl、10mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、2 mM MgCl_2 および2mM MgATP、pH7.0) に最終体積が $10\mu\text{l}$ になるように混合した。これらの混合物を30分間にわたって 37°C でインキュベートし、次いで、in vivoでの免疫に用いた。

C57BL/6系マウスを、 $10\mu\text{l}$ の上記混合物の1種またはTiterMax (登録商標) (Vaxell, Norcross, GA) とO v a -ペプチド ($5\mu\text{g}$) との混合物で1週間に一度の割合で全2週間にわたって皮内投与により免疫した。2回目の免疫を行った1週間後に脾細胞を摘出し、単核細胞 ($6\sim 8 \times 10^7$ 個) を 3×10^6 個の γ 線照射した (3000rad) 刺激細胞と共に培養した。この刺激細胞は、in vitroにてO v a -ペプチド (10mg/ml) で30分間にわたって室温で感作しておいた未投与のマウスから得て、洗浄し、3000radで照射した。

ワクチン接種マウスから得た脾細胞の細胞障害性を、O v a -ペプチドでパルスしたEL4細胞 (Ova-peptide pulsed EL4 cells) について18時間のクロム放出アッセイでアッセイした。CTLは、in vivoで免疫した脾細胞を、RPMI培地、10% FCS、ペニシリン、ストレプトマイシンおよび2mM L-グルタミン中で 10^6 個/mlの濃度で、 3×10^6 個/mlの γ 線照射した (3,000rad) 刺激細胞と共に5日間にわたって培養することによって作製した。標的細胞は、細胞を、 $250\mu\text{Ci}$ の ^{51}Cr クロム酸ナトリウム (DuPont, Boston, MA) の存在下でTris-リン酸緩衝液 (pH7.4) 中で 37°C にて1時間にわたって培養することによって調製した。洗浄後、幾つかの異なるエフェクター／標的 (E/T) 比となるように

10⁴個の⁵¹Cr標識化標的細胞をエフェクターリンパ球と混合し、18時間にわたってインキュベートした。上清を回収し、ガンマ・カウンターにて放射能を測定した。比溶解率(percent specific lysis)は、 $100 \times [(\text{CTLによるcpm放出} - \text{cpm自然放出}) / (\text{cpm最大放出} - \text{cpm自然放出})]$ として算出した。最大の応答は、1%Triton X-100の添加によって測定した。エフェクター細胞の不在下における全ての標的の自然放出は、最大放出の25%未満であった。

図1に示すように、h s p 7 0といずれか一方の方向性を有するハイブリッドペプチドとの組合せ(h s p 7 0 + B i P-OVAまたはh s p 7 0 + OVA-B i P)は、細胞の特異的溶解により測定したところ、h s p 7 0またはTiterMax (登録商標) アジュバントとO v a-ペプチド単独との組合せよりも高い免疫応答を引き起こした。

実施例 4

放射線照射刺激物である同遺伝子型の脾支持細胞とT細胞増殖因子とで2週間にわたって刺激することによって保持しておいたCTL細胞系を用いて、実施例3のアッセイを繰り返した。図2に示すように、h s p 7 0といずれか一方の方向性を有するハイブリッドペプチドとの組合せ(h s p 7 0 + B i P-OVAまたはh s p 7 0 + OVA-B i P)は、細胞の特異的溶解により測定したところ、h s p 7 0またはTiterMax (登録商標) アジュバントとO v a-ペプチド単独との組合せよりも高い免疫応答を引き起こした。このように、ハイブリッドペプチドによってもたらされる免疫応答は、さらなる経路を経ても持続し、経時的に維持されることが可能である。

実施例 5

h s p 7 0とB i P-OVAとの組合せおよびTiterMax (登録商標) とO v a-ペプチドとの組合せについて、脾細胞摘出の1週間前に1回だけ免疫することを用いて、実施例2の実験を繰り返した。図3に示すように、いずれか一方の組成物を用いたこの1回の免疫は、細胞免疫反応を引き起こすのに有効であった。

実施例 6

TiterMax (登録商標) と O v a-ペプチドまたは実施例1のハイブリッドペプチドとの混合物を用いて実施例3のアッセイを繰り返した。図4に示すように、O v a-ペプチドとハイブリッドペプチドの間には有意な差は全く見られず、このことは、ハイブリッドペプチドが熱ショックタンパク質と共に用いられる場合の効果の特異性を実証するものであった。

実施例7

図5Aおよび5Bは、実施例3の操作を繰り返して、マウスを h s p 7 0 単独、O v a-ペプチド単独、O v a-B i P 単独または B i P-O v a 単独で免疫した場合の結果を示す。図示したように、全ての場合における結果は、細胞を O v a-ペプチドでパルスした場合 (図5A) およびパルスしなかった場合 (図5B) 共に、同じであった。このことは、応答が、抗原 (O v a-ペプチドまたはハイブリッドペプチド) と熱ショックタンパク質との混合物の組合せによってもたらされるものであり、個々の成分のいずれかによるものではないことを実証するものである。

実施例8

O V A-B i P を 14 C-ホルムアルデヒドでアルキル化することによって、 14 C標識 O V A-B i P を調製した。300 μ l の10%DMSO/水に溶解した0.9mgの O V A-B i P を175 μ l の 14 C-ホルムアルデヒド (62 μ Ci) に添加し、50 μ l の新しく調製した200mM NaCNBH₃ を直ちに添加した。この反応物を混合し、25°Cで3時間にわたって静置した。この標識ペプチドを、C-4カラムでの逆相HPLCによって、15分間の0~100%アセトニトリル (0.1%TFA) 勾配で再精製した。

この O V A-B i P ペプチドの熱ショックタンパク質への結合能は、100 μ M (5 μ g) 14 C標識化 O V A-B i P を、50 μ g の B i P (実施例11のようにして調製したもの)、h s p 7 0 (実施例2のようにして調製したもの) または g r p 9 6 (実施例10のようにして調製したもの) と共に、最終体積が20 μ l の緩衝液

(50mM Mops, pH7.2、200mM NaCl、5mM酢酸マグネシウム) にて37°Cで30分間にわたってインキュベートすることによって測定した。次に、このサンプルを遠心し (マイクロフュージで5分)、結合バッファー (50mM Mops, pH7.2、200mM Na

Cl、5mM酢酸マグネシウム)に平衡化した17cm長のSephacryl S-300カラムにのせ、フラクションを滴下させて回収した。約225 μ lの各フラクションの50 μ lをシンチレーション液中で計測した。さらに各フラクションの10 μ lを12%SDS-PAGE還元ゲル上で泳動させた。図6は、カラムから溶出した各フラクションで検出された放射能を、SDS-PAGEによって測定した熱ショックタンパク質のピークの中心と共に示す。図示したように、BiPおよびhsp70では有意量の放射能が溶出し、したがって、ハイブリッドペプチドがこれら2種の熱ショックタンパク質に結合するということが明らかになった。gp96についての結果は不明確であった。その理由は、用いたカラムでは、フラクション11でのピーク(凝集現象を示す可能性がある)およびgp96のピーク(フラクション14)が近接して一緒に溶出するからである。

実施例9

¹²⁵I-OVA-BiPを調製するために、250 μ Ciのモノヨウ素化Bolton-Hunter試薬を密栓したビンに移し、該試薬が溶解している溶媒を穏やかなアルゴンガス気流下で留去した。乾燥した試薬に、100mM NaBO₃; pH8.9、10% DMSOに溶解した4.5mg/ml OVA-BiPの222 μ lを添加した。この反応物を混合し、25°Cで45分間にわたってインキュベートし、4°Cでさらに1時間にわたってインキュベートを続けた。この標識化ペプチドを、C-4カラムでの逆相HPLCによって、20分間の0~100%アセトニトリル(0.1% TFA)勾配で再精製した。

このヨウ素化OVA-BiPを、実施例7の熱ショックタンパク質と実質的に同様にしてBiPと組合せた。但し、このヨウ素化ペプチドは非常に低濃度だったので、1 μ l(約32ng)の標識ペプチドを5 μ gの未標識ペプチドと混合し、これを、20 μ lの結合緩衝液に溶解した50 μ gのBiPと共にインキュベートした点が異なる。ATP仲介ペプチド遊離を観察するために、30分間インキュベートした後、ATPを最終濃度が2mMになるまで添加し、さらに5分間にわたってインキュ

ベートした後で、遠心した。これらのサンプルを、2mM ATPを補充した結合緩衝液で平衡化した以外は上記と同じカラムに流した。

図7は、2mM ATPの存在下および不在下での¹²⁵I-OVA-BiPとBiPとの

混合物についての溶出プロフィールを示す。図示されているように、ATPの添加により、B i Pからのハイブリッドペプチドの遊離が起こる。このことは、ATPが熱ショックタンパク質からの結合タンパク質またはポリペプチドの遊離を仲介する、という観察と一致する。

実施例10

ヒト乳頭腫ウイルスに対する本発明によるワクチンに用いられるハイブリッドペプチドは、ペプチド合成装置を用いて以下のように調製される。

E 7 (11型) - B i P

Leu-Leu-Leu-Gly-Thr-Leu-Asn-Ile-Val-gly-ser-gly-His-Trp-Asp-Phe-
Ala-Trp-Pro-Trp [配列番号10]

B i P - E 7 (11型)

His-Trp-Asp-Phe-Ala-Trp-Pro-Trp-gly-ser-gly-Leu-Leu-Leu-Gly-Thr-
Leu-Asn-Ile-Val [配列番号11]

E 7 (16型) - B i P

Leu-Leu-Met-Gly-Thr-Leu-Gly-Ile-Val-gly-ser-gly-His-Trp-Asp-Phe-
Ala-Trp-Pro-Trp [配列番号12]

B i P - E 7 (16型)

His-Trp-Asp-Phe-Ala-Trp-Pro-Trp-gly-ser-gly-Leu-Leu-Met-Gly-Thr-
Leu-Gly-Ile-Val [配列番号13]

E 7 (18型) - B i P

Thr-Leu-Gln-Asp-Ile-Val-Leu-His-Leu-gly-ser-gly-His-Trp-Asp-Phe-
Ala-Trp-Pro-Trp [配列番号14]

BiP-E7(18型)

His-Trp-Asp-Phe-Ala-Trp-Pro-Trp-gly-ser-gly-Thr-Leu-Gln-Asp-Ile-
Val-Leu-His-Leu [配列番号15]

E7.1(6b型)-BiP

Gly-Leu-His-Cys-Tyr-Glu-Gln-Leu-Val-gly-ser-gly-His-Trp-Asp-Phe-
Ala-Trp-Pro-Trp [配列番号16]

BiP-E7.1(6b型)

His-Trp-Asp-Phe-Ala-Trp-Pro-Trp-gly-ser-gly-Gly-Leu-His-Cys-Tyr-
Glu-Gln-Leu-Val [配列番号17]

E7.2(6b型)-BiP

Pro-Leu-Lys-Gln-His-Phe-Gln-Ile-Val-gly-ser-gly-His-Trp-Asp-Phe-
Ala-Trp-Pro-Trp [配列番号18]

BiP-E7.2(6b型)

His-Trp-Asp-Phe-Ala-Trp-Pro-Trp-gly-ser-gly-Pro-Leu-Lys-Gln-His-
Phe-Gln-Ile-Val [配列番号19]

他の型のヒト・パリローマ・ウイルスに対するワクチンに用いられるハイブリッドペプチド、または他のウイルスや細菌等に由来するタンパク質は、HLA-A2ペプチド結合性モチーフを含有するMHCクラスI制限ペプチドエピトープに対するそれらの配列について調査することによって作製することが可能である。

実施例11

組換えGP96の調製

野生型またはKDEL欠失型のgp96ポリペプチドをコードするDNA配列を、

pRc/CMVからベクターpET11a (Novagen) へとサブクローニングした。こうして発現させることによって、成熟 g p 9 6 を細胞溶解物から精製することができた。

ベクターの構築

g p 9 6 をコードする配列 (pRc/CMV由来) のPCR増幅は、以下のプライマーを用いて行った。すなわち、野生型およびKDEL欠失型 g p 9 6 の双方に対する5'プライマーは、g p 9 6 の成熟型のアミノ末端をコードするDNA配列およびNde I制限部位 (CATATG) と相補的であり、AGTがイニシエーター・コドンを形成している。

5' AGA TAT ACA TAT GGA TGA TGA AGT CGA CGT GG 3' [配列番号20]

3'プライマーは、g p 9 6 のカルボキシル末端をコードする g p 9 6 のDNA配列と相補的であり、KDEL欠失型変異体に対するプライマーにおいて取り除かれたKDEL配列をコードするヌクレオチドを有していた。両プライマーは、以下のよう、BamHI制限部位 (GGATCC) およびそれに続く終止コドンを含む。

野生型：

5' TCG GAT CCT TAC AAT TCA TCC TTC TCT GTA GAT TC 3' [配列番号21]

KDEL欠失型：

5' TCG GAT CCT TAC TCT GTA GAT TCC TTT TC 3' [配列番号22]

PCR産物を、NdeIおよびBamHIで切断し、同じくこれらの酵素で切断しておいたpET11a(Novagen)に連結した。この連結産物を用いて、コンピテントなBL21細胞を形質転換した。得られたクローンを発現スクリーニングによってスクリーニングした。

発現および精製

この操作は野生型またはKDE-欠失型 g p 9 6 について同じである。野生型またはKDL-欠失型 g p 9 6 のいずれかをコードする配列を含むpET11aで形質転換した大腸菌BL21細胞の2リットルを、200 μ g/mlのアンピシリンを補足した2xTY培地にて37°Cで、それらが600nmでの吸光度が0.5~0.6に達するまで増殖させた。

この時点において、それらを1mM IPTGの添加により誘導した。これらの細胞をさ

らに2～5時間にわたって37℃で増殖させ、次いで10分間の遠心分離(7000 x G)によって回収した。この細胞ペレットを50mM Hepes(pH7.5)、50mM KCl、5mM酢酸マグネシウム、20%スクロース、1mM PMSFに再懸濁し、フレンチプレスに3回通過させることによって細胞を溶解した。この細胞抽出物を1時間にわたって20000 x Gで遠心することによって清澄化し、上清を保持した。

この上清を冷たい50mM Hepes(pH7.5)で2倍希釈し、50mM Mops(pH7.4)、10mM NaCl、5mM酢酸マグネシウムで平衡化しておいた50mlのDE52陰イオン交換樹脂(Whatman)を含有するPharmacia XK26カラムにのせた。結合タンパク質を0～1000mM NaCl勾配で溶出した。g p 9 6を含有するフラクションをSDS-PAGEにより同定してプールした。

プールしたこれらのg p 9 6含有フラクションを冷たい50mM Mops(pH7.4)で2倍希釈し、0.5M K₂HPO₄(pH7.2)、50mM KClで洗浄しかつ10mM K₂HPO₄(pH7.2)、50mM KClで平衡化しておいた、15mlのヒドロキシアパタイト樹脂(BioRad)を含有するPharmacia XK16カラムにのせた。結合タンパク質を10～500mM K₂HPO₄(pH7.2)勾配でKCl濃度を50mMに一定に保持して溶出した。g p 9 6を含有するフラクションをSDS-PAGEで同定してプールした。

プールしたこれらのg p 9 6含有フラクションを、最終的に、50mM Mops(pH7.2)、500mM NaClで平衡化しておいた、25mlのフェニルセファロース(phenyl Sepharose)(Pharmacia)を含有するPharmacia XK26カラムにのせ、500～0mMのNaCl勾配で溶出した。本質的に純粋なg p 9 6を含有するフラクションをプールし、濾過によって濃縮し、10%グリセロールに調製した。この精製したg p 9 6を-80℃で凍結した。

実施例12

B i P発現ベクターの構築および組換え体B i Pの精製

野生型またはKDEL欠失型B i PポリペプチドをコードするDNA配列を、pCDNA3からベクターpET22(Novagen)へとサブクローニングし、このことによって、該DNA配列は、発現されたB i Pが細菌発現ベクターである大腸菌のペリプラ

ズム(細胞周辺腔)に向かうようにするシグナル配列をコードするDNA配列の

後部であってかつ同じ読み枠になるように配置された。ペリプラズムへの輸送の際に、上記のシグナル配列は取り除かれ、したがって、成熟した野生型またはKDEL欠失型のB i Pが、細胞質ゾルh s p 70が混入することなしにペリプラズムから回収できる。

ベクターの構築

B i Pをコードする配列 (pCDNA3由来) のPCR増幅は、以下のプライマーを用いて行った。すなわち、野生型およびKDEL欠失型のB i Pの双方に対する5'プライマーは、B i Pの成熟型のアミノ末端をコードするB i PのDNA配列と相補的であり、イニシエーターATGコドンのすぐ上流にMscI制限部位 (TGGCCA) を有していた。

5' AGA TAT GTG GCC ATG GAG GAG GAG GAG AAG 3' [配列番号23]

3' プライマーは、B i Pのカルボキシル末端をコードするB i PのDNA配列に相補的であり、KDEL欠失型変異体に対するプライマーでは取り除かれているKDEL配列をコードするヌクレオチドを有していた。両プライマーは、以下のように、BamHI制限部位 (GGATCC) およびそれに続く終止コドンを含む。

野生型:

5' TCG GAT CCC TAC AAC TCA TCT TTT TCT G 3' [配列番号24]

KDEL欠失型:

5' TCG GAT CCC TAT TCT GAT GTA TCC TCT TCA CC 3' [配列番号25]

このPCR産物を、MscIおよびBamHIで切断し、同じくこれらの酵素で切断しておいたpET22 (Novagen) に連結した。この連結産物を用いて、コンピーテントなBL21細胞を形質転換した。得られたクローンを発現スクリーニングによってスクリーニングした。

発現および精製

この操作は、野生型またはKDEL欠失型B i Pについて同じである。野生型またはKDEL欠失型B i Pのいずれかをコードする配列を含むpET22で形質転換したBL21細胞の2リットルを、200 μ g/mlのアンピシリンを補足した2xTY培地にて37°Cで、それら細胞が600nmでの吸光度が0.5~0.6に達するまで増殖させた。この

時点で、それら細胞を1mM IPTGの添加によって誘導した。これら細胞をさらに2～5時間にわたって37℃で増殖させ、次いで、10分間にわたって7000 x Gで遠心分離することによって回収した。この細胞ペレットを、30mM Tris(pH8.0)、20%スクロース、1mM PMSFの400ml（または80ml/mg細胞）に徐々に再懸濁した。細胞の再懸濁に続いて、EDTAを1mMまで添加し、この懸濁液を室温で5分間にわたってインキュベートした。次に、これらの細胞を15分間にわたって7000 x Gで遠心し、氷冷した5mM MgSO₄、1mM PMSFの400mlに再懸濁し、4℃で10分間にわたってインキュベートした。次いで、これらの細胞をもう1度遠心して、上清を保持した。その理由は、ここにおいて、この上清がペリプラズム抽出物を構成するからである。

このペリプラズム抽出物を、50mM Mops(pH7.4)、10mM NaClで平衡化しておいた、25mlのDE52陰イオン交換樹脂(Whatman)を含有するPharmacia XK26カラムにのせた。結合タンパク質を10～500mM NaCl勾配で溶出した。溶出したB i Pを含有するフラクションをSDS-PAGEで同定してプールした。次に、プールしたこのB i Pを、50mM Mops(pH7.4)、100mM NaCl、5mM酢酸マグネシウム、10mM KClで平衡化しておいた、10mlのATPアガロースを含有するPharmacia XK26カラムにかけた。プールしたB i P含有フラクションをのせた後、カラムを280nmでの吸光度のベースラインがゼロに達するまで洗浄した。最後に、結合B i Pを、1mM ATPを補足した同じ緩衝液で溶出した。この溶出物を濾過によって濃縮し、10%グリセロールに調製し、-80℃で凍結保存した。

実施例13

組換え体マウスHSP40の作製

プラスミドの構築

h s p 4 0の開始メチオニンにNdeI部位を導入するのに用いるDNA断片は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により、Nde-プライマー：

5' -CCGCAGGAGGGGCATATGGGTAAAGAC-3'

[配列番号26]

およびNco-プライマー：

5' -GAGGGTCTCCATGGAATGTGTAGCTG-3'

[配列番号27]

を用いて構築した。後者は、ヒト h s p 4 0 c DNA クローン (すなわち、pBSI I-hsp40) のヌクレオチド322に対応するNcoI部位を含有しており (Ohtsuka, K., Biochem. Biophys. Res. Commun. 197:235-240(1991))、これを鋳型として用いた。pBSII-hsp40の h s p 4 0 コード化領域をBamHIおよびSacIで消化し、プラスミドpET-3a(Novagen, Inc.)の改変型の相補的部位に挿入した。

PCRで増幅したDNAをNdeIおよびNcoIで消化し、上記プラスミドのNdeI-NcoI領域を置き換えて、h s p 4 0を発現するプラスミドpET/hsp40を作製した。

タンパク質の精製

組換え体ヒト h s p 4 0 を精製するために、上記プラスミドpET/hsp40をBL21(DE3)細胞に形質転換し、37°Cで増殖させた。0.4mMイソプロピルチオ-b-D-ガラクトシド (IPTG) と共に2時間インキュベートした後、細胞をフレンチ・プレッシャー・セル (French Pressure Cell) (SLM Instruments, Inc.) にて1mM PMSFを含有する緩衝液A [20mM Tris-HCl (pH7.5)、20mM NaCl、1mM EDTA] 中で溶解した。清澄にした溶解物を氷上で1時間にわたってDEAE-Sephacel (Pharmacia) と混合した。結合していない物質を回収し、樹脂を緩衝液Aで洗浄した。流出物 (flow-through) と第1の洗浄物とを合わせて、100mMリン酸カリウム (pH7.6) で平衡化したヒドロキシアパタイトHTPカラム (Bio-Rad) にのせた。このカラムを同じ緩衝液で洗浄し、h s p 4 0 を100~300mMリン酸カリウム (pH7.6) の直線勾配で溶出した。ピークのフラクションを、DEAE-Sephacelカラムを通した後でHTPカラムにて再度クロマトグラフした。

実施例14

ワクチン組成物は、組換え体マウス h s p 7 0 (実施例2のようにして調製したもの) と、組換え体ヒト h s p 4 0 (実施例13のようにして調製したもの) と、O v a -ペプチド: Ser-Ile-Ile-Asn-Phe-Glu-Lys-Leu

[配列番号7]

とを最終体積が10 μ lの緩衝液 (20mM Hepes pH7.0、150mM KCl、10mM (NH₄)₂SO₄、2mM MgCl₂、および2mM MgATP) 中に以下のように組合せることによって調製した。

サンプル	hsp70	hsp40	ova
OVA単独	なし	なし	5 ug
Hsp70/40	15 ug	8 ug	なし
Hsp70/40 + OVA	15 ug	8 ug	5 ug
Hsp70 + OVA	15 ug		5 ug

これらの混合物を30分間にわたって37℃でインキュベートした後で、免疫化に使用した。

C57BL/6系マウスを、週に1回、全体で2週間にわたって上記混合物の1種またはTiterMax（登録商標）（Vaxcell, Norcross, GA）とO v a-ペプチド（5 μ g）との混合物の10 μ lを皮内投与することによって免疫化した。2回目の免疫を行った1週間後、脾細胞を摘出し、単核細胞（6～8 $\times 10^7$ 個）を3 $\times 10^6$ 個の γ 線照射した（3000rad）刺激細胞と共に培養した。この刺激細胞は、in vitroにてO v a-ペプチド（10mg/ml）で30分間にわたって室温で感作しておいた未投与のマウスから得て、洗浄し、3000radで放射線照射した。

ワクチン投与したマウスから得た脾細胞の細胞障害性を、O v a-ペプチドとE L4細胞との系について18時間のクロム放出アッセイでアッセイした。CTLは、in vivoで免疫した脾細胞を5日間にわたって、RPMI培地、10%FCS、ペニシリン、ストレプトマイシンおよび2mM-グルタミン中で1 $\times 10^6$ 個/mlの濃度で、3 $\times 10^6$ 個/mlの γ 線照射した（3000rad）刺激細胞と共に培養することによって作製した。標的細胞は、細胞を、250 μ Ciの 51 Crクロム酸ナトリウム（DuPont, Boston, MA）の存在下でTris-リン酸緩衝液（pH7.4）中で37℃で1時間にわたって培養することによって作製した。洗浄した後、幾つかの異なるエフェクター/標的（E/T）比となるように1 $\times 10^4$ 個の 51 Cr標識化標的細胞をエフェクターリンパ球と混合し、18時間にわたってインキュベートした。上清を回収し、放射

能をガンマ・カウンターにて測定した。比溶解率は、100 \times [（CTLによるcpm放出－cpm自然放出） / （cpm最大放出－cpm自然放出）]として算出した。最大応答は1%Triton X-100の添加によって測定した。エフェクター細胞不在下での全標的

の自然放出は、最大放出の25%未満であった。

この研究の結果を図8に示す。図示されるように、抗原とh s p 7 0またはh s p 7 0とh s p 4 0との混合物との組合せは、抗原に対するCTL応答を引き起こすのに有効であったが、一方、抗原単独または熱ショックタンパク質同士の組合せは有効ではなかった。

実施例15

EL4細胞の代わりにEG7リンパ腫細胞 [Mooreら、Cell 54:777-785(1988)] を用いて実施例14の実験を繰り返した。結果を図9に示し、EL4細胞を用いた場合に観察される結果と比較する。

本明細書では多種の刊行物が引用されており、それらの内容は、参考として、その全文を本明細書中に組み入れるものとする。

配列表

(1)一般情報:

(i)出願人: スローアン-ケタリングインスティテュートフォアキャンサーリサーチ

ロスマン、ジェームスE.
ハートル、F. ユールリッヒ
ホー、メーH.
ホートン、アラン
タケウチ、ヨシズミ
メイヨー、マークガン

(ii)発明の名称: 癌および感染性疾患の治療方法およびそれに有用な組成物

(iii)配列の数: 28

(iv)通信先:

(A)名宛人: オッペダール&ラーソン
(B)通り名: 1992 カマーストリートスイート309
(C)市名: ヨークタウン
(D)州名: ニューヨーク
(E)国名: アメリカ合衆国
(F)郵便番号: 10598

(v)コンピューター読取り可能形式:

(A)媒体の型: フロッピーディスクー 3.5インチ、容量 1.44Mb
(B)コンピューター: IBM互換性
(C)オペレーティングシステム: MSDOS
(D)ソフトウェア: Word Perfect

(vi)本出願のデータ:

(A)出願番号:
(B)出願日:

(C)分類:

(vii)原出願のデータ

(A)出願番号:

(B)出願日:

(viii)代理人の情報:

(A)名前: ラーソン、マリーナ T.

(B)登録番号: 32, 038

(C)参照/文書番号: MSK. P. -019-WO

(ix)テレコミュニケーション情報:

(A)電話: (914) 245-3252

(B)テレファックス: (914) 962-4330

(C)テレックス:

(2)配列番号: 1:

(i)配列の特色:

(A)配列の長さ: 8

(B)配列の型: アミノ酸

(C)鎖の数:

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: ペプチド

(iii)ハイポセティカル: no

(v)フラグメント型: 中間部

(vi)起源:

(A)生物名: マウス

(ix)配列の特徴:

(D)その他の情報: 熱ショック結合性配列

(xi)配列:

His Trp Asp Phe Ala Trp Pro Trp
5

(2)配列番号：2：

(i)配列の特色：

(A)配列の長さ：9

(B)配列の型：アミノ酸

(C)鎖の数：

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：ペプチド

(iii)ハイボセティカル：no

(v)フラグメント型：中間部

(vi)起源：

(A)生物名：ヒト

(ix)配列の特徴：

(D)その他の情報：HLA-A2ペプチド結合性モチーフ、2位のLeuはMetであってもよく、6位のValはIle、LeuまたはThrであってもよく、9位のValはLeuであってもよい。

(xi)配列：

Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Val Xaa Xaa Val
5

(2)配列番号：3：

(i)配列の特色：

(A)配列の長さ：9

(B)配列の型：アミノ酸

(C)鎖の数：

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：ペプチド

(iii)ハイボセティカル：no

(v)フラグメント型：中間部

(vi)起源：

(A)生物名：ヒト

(ix)配列の特徴:

(D)その他の情報:HLA-A2ペプチド結合性モチーフ、2位のLeuはMetであってもよい。

(xi)配列:

Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val
5

(2)配列番号:4:

(i)配列の特色:

(A)配列の長さ:9

(B)配列の型:アミノ酸

(C)鎖の数:

(D)トポロジー:直鎖状

(ii)配列の種類:ペプチド

(iii)ハイポセティカル:no

(v)フラグメント型:中間部

(vi)起源:

(A)生物名:

(ix)配列の特徴:

(D)その他の情報:熱ショックタンパク質結合性モチーフ

(xi)配列:

Phe Trp Gly Leu Trp Pro Trp Glu
5

(2)配列番号:5:

(i)配列の特色:

(A)配列の長さ:5

(B)配列の型:アミノ酸

(C)鎖の数:

(D)トポロジー:直鎖状

(ii)配列の種類:ペプチド

(iii)ハイボセティカル：no

(v)フラグメント型：中間部

(vi)起源：

(A)生物名：ヒト

(ix)配列の特徴：

(D)その他の情報：HLA-DRペプチド結合性モチーフ

(xi)配列：

Gln Lys Arg Ala Ala
5

(2)配列番号：6：

(i)配列の特色：

(A)配列の長さ：5

(B)配列の型：アミノ酸

(C)鎖の数：

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：ペプチド

(iii)ハイボセティカル：no

(v)フラグメント型：中間部

(vi)起源：

(A)生物名：ヒト

(ix)配列の特徴：

(D)その他の情報：HLA-DRペプチド結合性モチーフ

(xi)配列：

Gln Lys Arg Ala Ala
5

(2)配列番号：7：

(i)配列の特色：

(A)配列の長さ：8

(B)配列の型：アミノ酸

(C)鎖の数 :

(D)トポロジー : 直鎖状

(ii)配列の種類 : ペプチド

(iii)ハイポセティカル : no

(v)フラグメント型 : 中間部

(vi)起源 :

(A)生物名 : ニワトリ

(ix)配列の特徴 :

(D)その他の情報 : OVA-ペプチド

(xi)配列 :

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
5

(2)配列番号 : 8 :

(i)配列の特色 :

(A)配列の長さ : 19

(B)配列の型 : アミノ酸

(C)鎖の数 :

(D)トポロジー : 直鎖状

(ii)配列の種類 : ペプチド

(iii)ハイポセティカル : no

(v)フラグメント型 : 中間部

(vi)起源 :

(A)生物名 :

(ix)配列の特徴 :

(D)その他の情報 :

(xi)配列 : Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Gly Ser Gly His
5 10

Trp Asp Phe Ala Trp Pro Trp
15

(2)配列番号 : 9 :

(i)配列の特色:

(A)配列の長さ: 19

(B)配列の型: アミノ酸

(C)鎖の数:

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: ペプチド

(iii)ハイボセティカル: no

(v)フラグメント型: 中間部

(vi)起源:

(A)生物名:

(ix)配列の特徴:

(D)その他の情報:

(x)配列:

His Trp Asp Phe Ala Trp Pro Trp Gly Ser Gly Ser
5 10

Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
15

(2)配列番号: 10:

(i)配列の特色:

(A)配列の長さ: 20

(B)配列の型: アミノ酸

(C)鎖の数:

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: ペプチド

(iii)ハイボセティカル: yes

(v)フラグメント型: 中間部

(vi)起源:

(A)生物名:

(ix)配列の特徴:

(D)その他の情報: ヒト乳頭腫ウイルスワクチン用のハイブリッドペプチド

(xi)配列:

```

Leu Leu Leu Gly Thr Leu Asn Ile Val Gly Ser Gly
          5                      10
His Trp Asp Phe Ala Trp Pro Trp
          15                      20

```

(2)配列番号: 11:

(i)配列の特色:

(A)配列の長さ: 20

(B)配列の型: アミノ酸

(C)鎖の数:

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: ペプチド

(iii)ハイボセティカル: yes

(v)フラグメント型: 中間部

(vi)起源:

(A)生物名:

(ix)配列の特徴:

(D)その他の情報: ヒト乳頭腫ウイルスワクチン用のハイブリッドペプチド

(xi)配列:

```

His Trp Asp Phe Ala Trp Pro Trp Gly Ser Gly Leu
          5                      10
Leu Leu Gly Thr Leu Asn Ile Val
          15                      20

```

(2)配列番号: 12:

(i)配列の特色:

(A)配列の長さ: 20

(B)配列の型: アミノ酸

(C)鎖の数:

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: ペプチド

(iii)ハイボセティカル: yes

(v)フラグメント型：中間部

(vi)起源：

(A)生物名：

(ix)配列の特徴：

(D)その他の情報：ヒト乳頭腫ウイルスワクチン用のハイブリッドペプチド

(xi)配列：

```

Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Gly Ser Gly
                    5                10
His Trp Asp Phe Ala Trp Pro Trp
          15                20

```

(2)配列番号：13：

(i)配列の特色：

(A)配列の長さ：20

(B)配列の型：アミノ酸

(C)鎖の数：

(D)トポロジー：直鎖状

(II)配列の種類：ペプチド

(iii)ハイボセティカル：yes

(v)フラグメント型：中間部

(vi)起源：

(A)生物名：

(ix)配列の特徴：

(D)その他の情報：ヒト乳頭腫ウイルスワクチン用のハイブリッドペプチド

(xi)配列：

```

His Trp Asp Phe Ala Trp Pro Trp Gly Ser Gly Leu
                    5                10
Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val
          15                20

```

(2)配列番号：14：

(i)配列の特色：

(A)配列の長さ：20

(B)配列の型：アミノ酸

(C)鎖の数：

(D)トポロジー：直鎖状

(II)配列の種類：ペプチド

(iii)ハイボセティカル：yes

(v)フラグメント型：中間部

(vi)起源：

(A)生物名：

(ix)配列の特徴：

(D)その他の情報：ヒト乳頭腫ウイルスワクチン用のハイブリッドペプチド

(xi)配列：

Thr	Leu	Gln	Asp	Ile	Val	Leu	His	Leu	Gly	Ser	Gly
				5					10		
His	Trp	Asp	Phe	Ala	Trp	Pro	Trp				
		15				20					

(2)配列番号：15：

(i)配列の特色：

(A)配列の長さ：20

(B)配列の型：アミノ酸

(C)鎖の数：

(D)トポロジー：直鎖状

(II)配列の種類：ペプチド

(iii)ハイボセティカル：yes

(v)フラグメント型：中間部

(vi)起源：

(A)生物名：

(ix)配列の特徴：

(D)その他の情報：ヒト乳頭腫ウイルスワクチン用のハイブリッドペプチド

(xi)配列:

His	Trp	Asp	Phe	Ala	Trp	Pro	Trp	Gly	Ser	Gly	Thr
				5					10		
Leu	Gln	Asp	Ile	Val	Leu	His	Leu				
		15					20				

(2)配列番号: 16:

(i)配列の特色:

(A)配列の長さ: 20

(B)配列の型: アミノ酸

(C)鎖の数:

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: ペプチド

(iii)ハイポセティカル: yes

(v)フラグメント型: 中間部

(vi)起源:

(A)生物名:

(ix)配列の特徴:

(D)その他の情報: ヒト乳頭腫ウイルスワクチン用のハイブリッドペプチド

(xi)配列:

Gly	Leu	His	Cys	Tyr	Glu	Gln	Leu	Val	Gly	Ser	Gly
				5						10	
His	Trp	Asp	Phe	Ala	Trp	Pro	Trp				
		15					20				

(2)配列番号: 17:

(i)配列の特色:

(A)配列の長さ: 20

(B)配列の型: アミノ酸

(C)鎖の数:

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: ペプチド

(iii)ハイポセティカル: yes

(v)フラグメント型：中間部

(vi)起源：

(A)生物名：

(ix)配列の特徴：

(D)その他の情報：ヒト乳頭腫ウイルスワクチン用のハイブリッドペプチド

(xi)配列：

```

His Trp Asp Phe Ala Trp Pro Trp Gly Ser Gly Gly
          5                      10
Leu His Cys Tyr Glu Gln Leu Val
      15                      20

```

(2)配列番号：18：

(i)配列の特色：

(A)配列の長さ：20

(B)配列の型：アミノ酸

(C)鎖の数：

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：ペプチド

(iii)ハイボセティカル：yes

(v)フラグメント型：中間部

(vi)起源：

(A)生物名：

(ix)配列の特徴：

(D)その他の情報：ヒト乳頭腫ウイルスワクチン用のハイブリッドペプチド

(xi)配列：

```

Pro Leu Lys Gln His Phe Gln Ile Val Gly Ser Gly
          5                      10
His Trp Asp Phe Ala Trp Pro Trp
      15                      20

```

(2)配列番号：19：

(i)配列の特色：

(A)配列の長さ：20

(B)配列の型：アミノ酸

(C)鎖の数：

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：ペプチド

(iii)ハイボセティカル：yes

(v)フラグメント型：中間部

(vi)起源：

(A)生物名：

(ix)配列の特徴：

(D)その他の情報：ヒト乳頭腫ウイルスワクチン用のハイブリッドペプチド

(xi)配列：

His	Trp	Asp	Phe	Ala	Trp	Pro	Trp	Gly	Ser	Gly	Pro
				5					10		
Leu	Lys	Gln	His	Phe	Gln	Ile	Val				
		15				20					

(2)配列番号：20：

(i)配列の特色：

(A)配列の長さ：32

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：他の核酸

(iii)ハイボセティカル：no

(iv)アンチセンス：yes

(v)フラグメント型：中間部

(vi)起源：

(A)生物名：

(ix)配列の特徴：

(D)その他の情報：gp96の増幅プライマー

(xi)配列：

AGATATACAT ATGGATGATG AAGTCGACGT GG 32

(2)配列番号：21：

(i)配列の特色：

(A)配列の長さ：35

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：他の核酸

(iii)ハイボセティカル：no

(iv)アンチセンス：no

(v)フラグメント型：中間部

(vi)起源：

(A)生物名：

(ix)配列の特徴：

(D)その他の情報：gp96の増幅プライマー

(xi)配列：

TCGGATCCTT ACAATTCATC CTTCTCTGTA GATTC 35

(2)配列番号：22：

(i)配列の特色：

(A)配列の長さ：29

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：他の核酸

(iii)ハイボセティカル：no

(iv)アンチセンス：no

(v)フラグメント型：中間部

(vi)起源：

(A)生物名：

(ix)配列の特徴：

(D)その他の情報：g p 9 8 の増幅プライマー

(xi)配列：

TCGGATCCTT ACTCTGTAGA TTCCTTTTC

29

(2)配列番号：23：

(i)配列の特色：

(A)配列の長さ：30

(B)配列の型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：他の核酸

(iii)ハイボセティカル：no

(iv)アンチセンス：yes

(v)フラグメント型：中間部

(vi)起源：

(A)生物名：

(ix)配列の特徴：

(D)その他の情報：B i P の増幅プライマー

(xi)配列：

AGATATGTGG CCATGGAGGA GGAGGACAAG

30

(2)配列番号：24：

(1)配列の特色:

(A)配列の長さ: 28

(B)配列の型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: 他の核酸

(iii)ハイボセティカル: no

(iv)アンチセンス: no

(v)フラグメント型: 中間部

(vi)起源:

(A)生物名:

(ix)配列の特徴:

(B)その他の情報: B i Pの増幅プライマー

(xi)配列:

TCGGATCCCT ACAACTCATC TTTTCTC

28

(2)配列番号: 25:

(1)配列の特色:

(A)配列の長さ: 32

(B)配列の型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: 他の核酸

(iii)ハイボセティカル: no

(iv)アンチセンス: no

(v)フラグメント型: 中間部

(vi)起源:

(A)生物名:

(ix)配列の特徴:

(D)その他の情報: B i P の増幅プライマー

(xi)配列:

TCGGATCCCT ATTCTGATGT ATCCTCTTCA CC

32

(2)配列番号: 26:

(i)配列の特色:

(A)配列の長さ: 27

(B)配列の型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: 他の核酸

(iii)ハイボセティカル: no

(iv)アンチセンス: yes

(v)フラグメント型: 中間部

(vi)起源:

(A)生物名:

(ix)配列の特徴:

(D)その他の情報: h s p 40 の増幅プライマー

(xi)配列:

CCGCAGGAGG GGCATATGGG TAAAGAC

27

(2)配列番号: 27:

(i)配列の特色:

(A)配列の長さ: 26

(B)配列の型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：他の核酸

(iii)ハイボセティカル：no

(iv)アンチセンス：no

(v)フラグメント型：中間部

(vi)起源：

(A)生物名：

(ix)配列の特徴：

(D)その他の情報：h s p 4 0 の増幅プライマー

(xi)配列：

GAGGGTCTCC ATGGAATGTG TAGCTG

26

(2)配列番号：28：

(i)配列の特色：

(A)配列の長さ：9

(B)配列の型：アミノ酸

(C)鎖の数：

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：ペプチド

(iii)ハイボセティカル：no

(v)フラグメント型：中間部

(vi)起源：

(A)生物名：ヒト

(ix)配列の特徴：

(D)その他の情報：HLA-A2ペプチド結合性モチーフ、2位のValはGlnであっ

てもよい。

(xi)配列：

Xaa Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu

【図1】

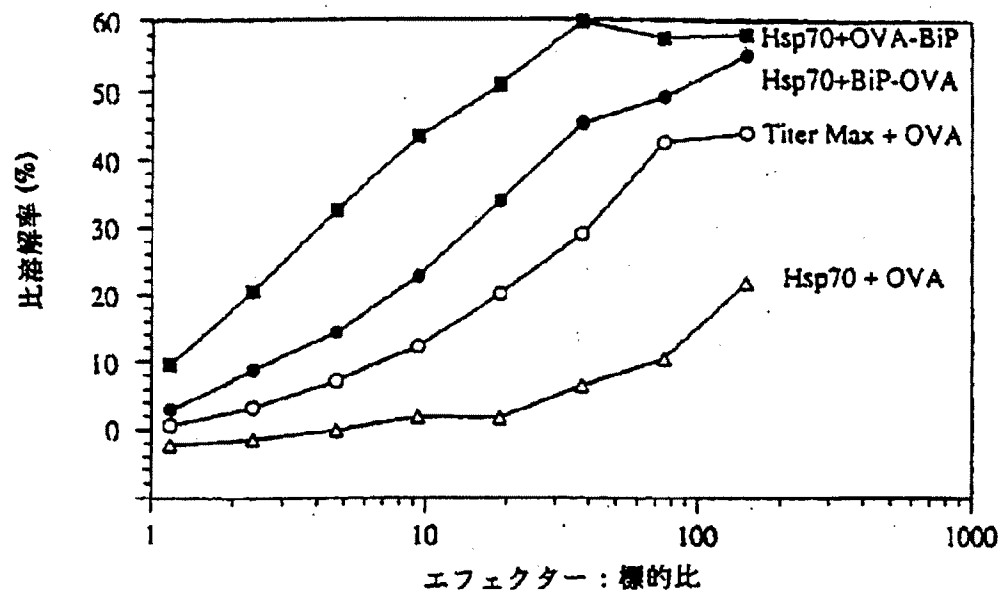


Fig. 1

【図2】

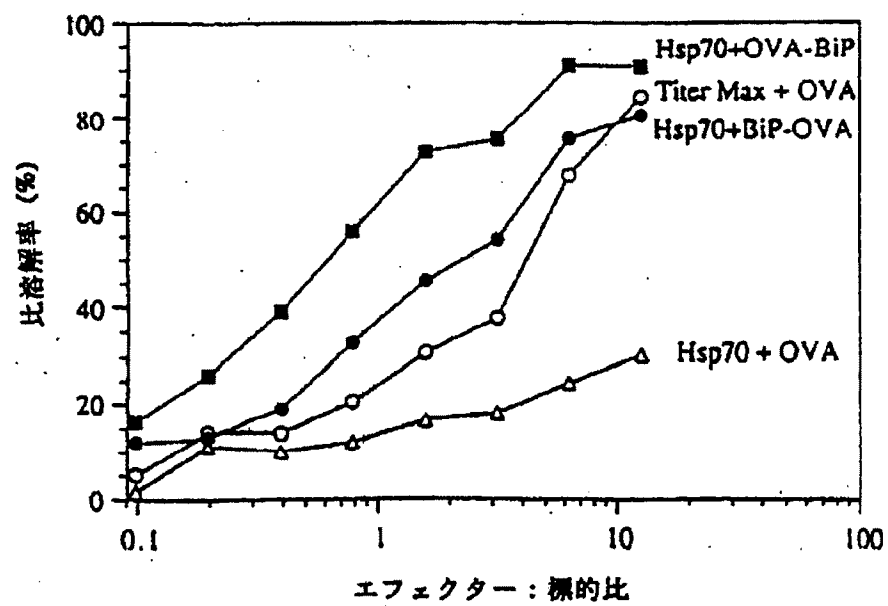


Fig. 2

【図3】

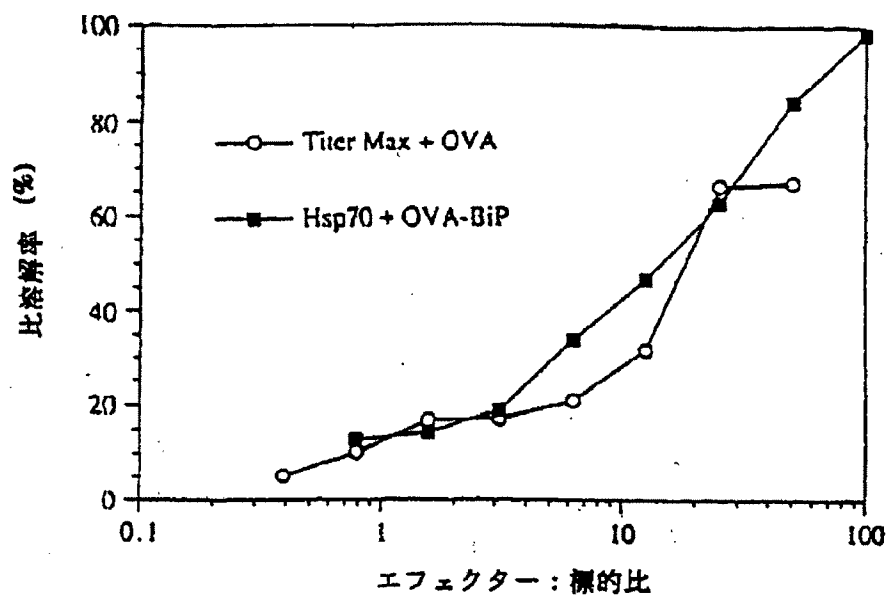


Fig. 3

【図4】

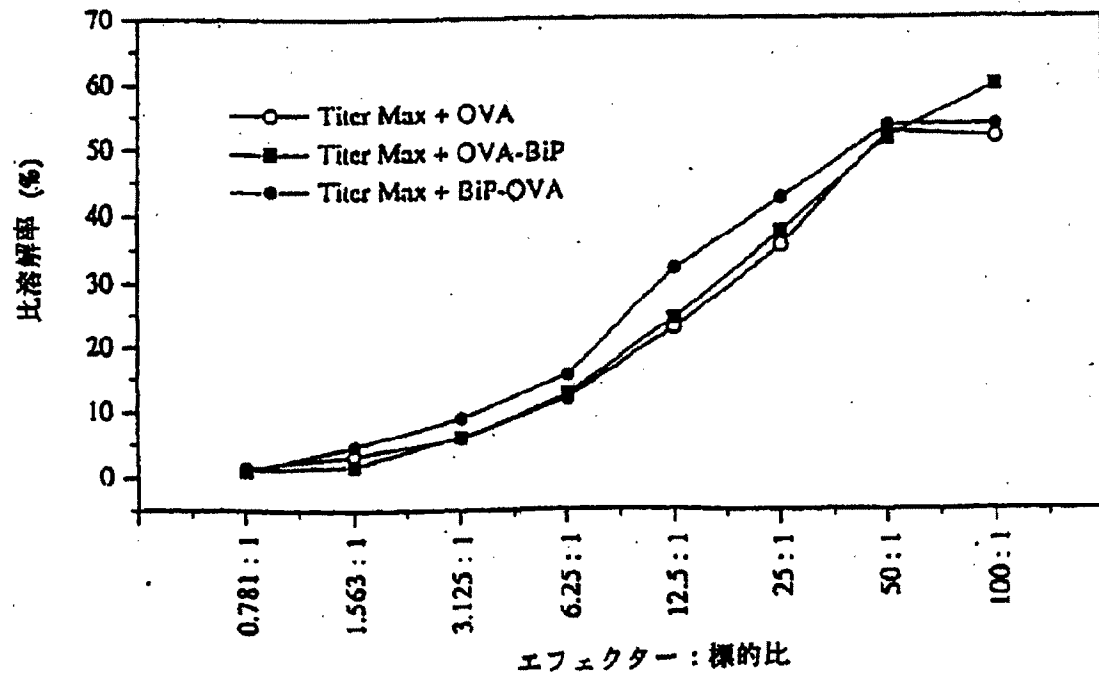


Fig. 4

【図5】

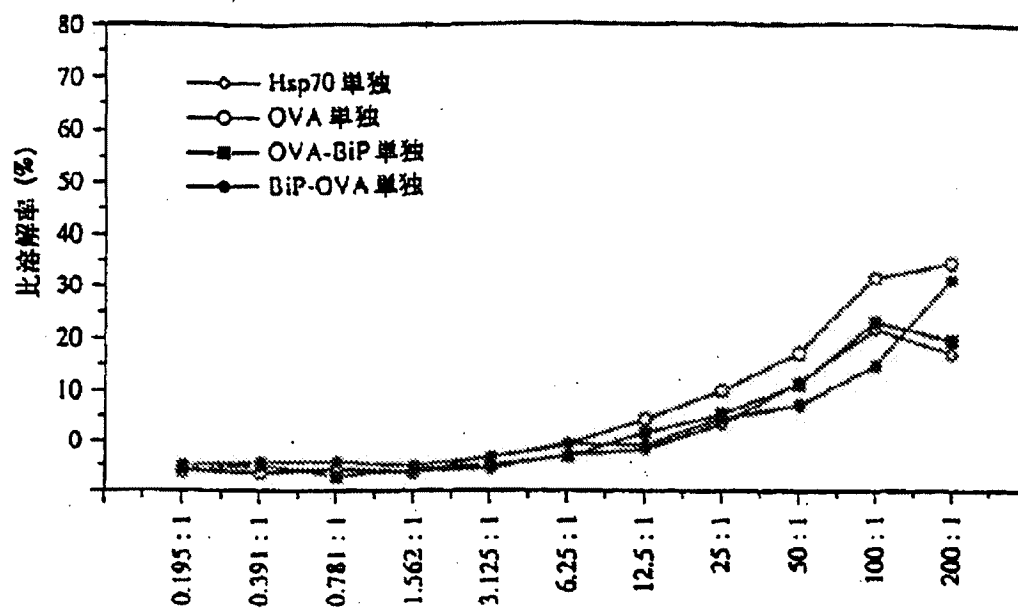


Fig. 5B

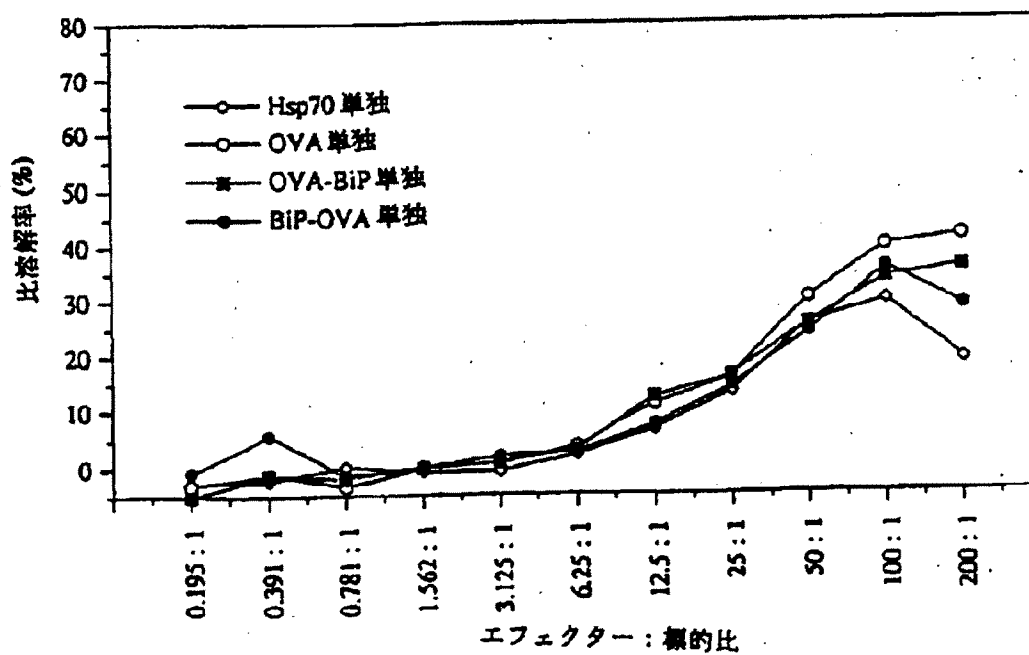


Fig. 5A

【図6】

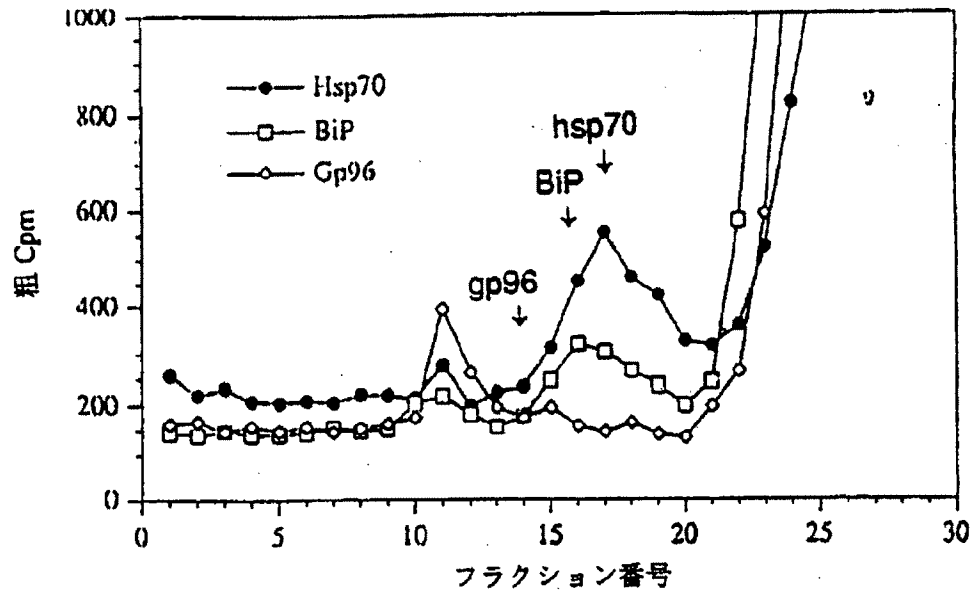


Fig. 6

【図7】

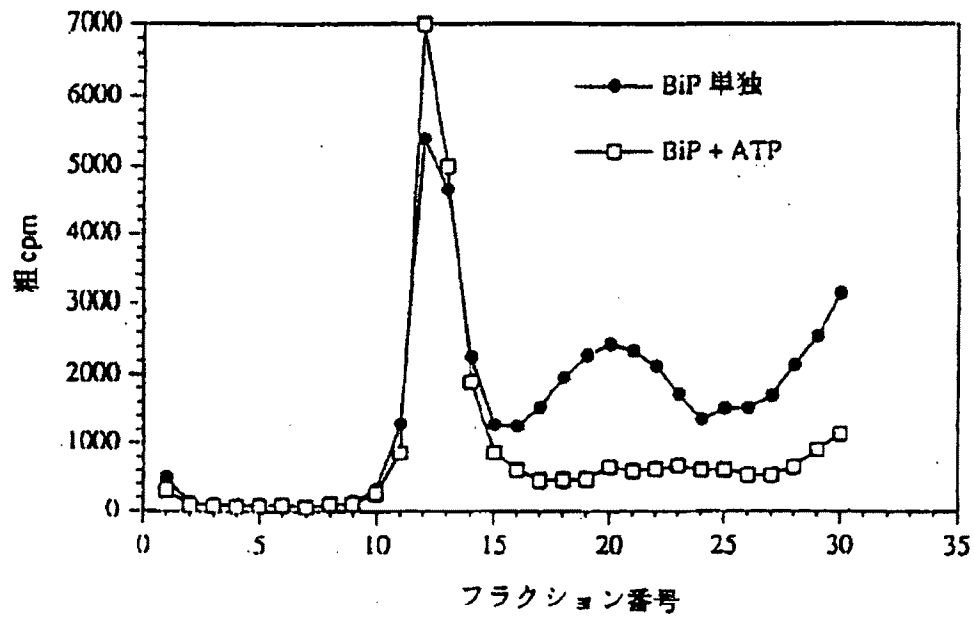


Fig. 7

【図8】

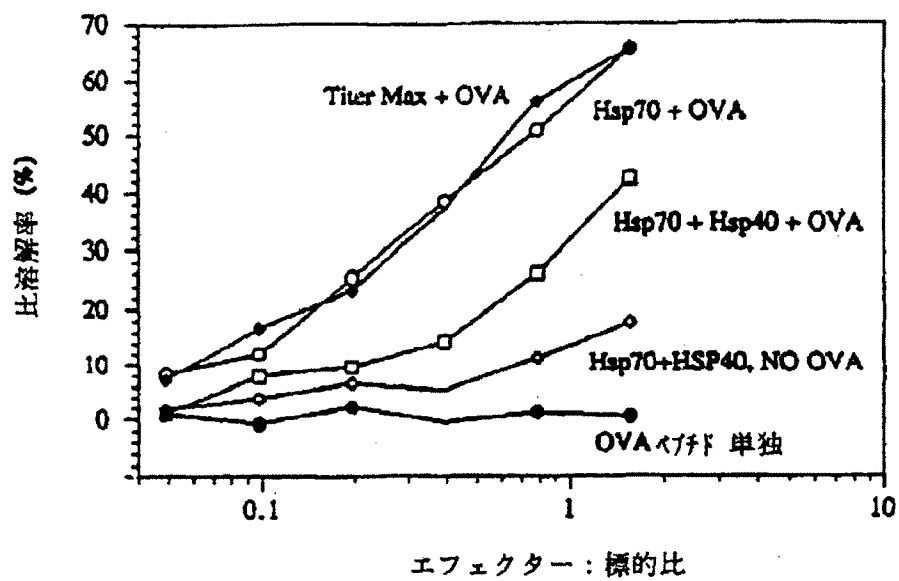


Fig. 8

【図9】

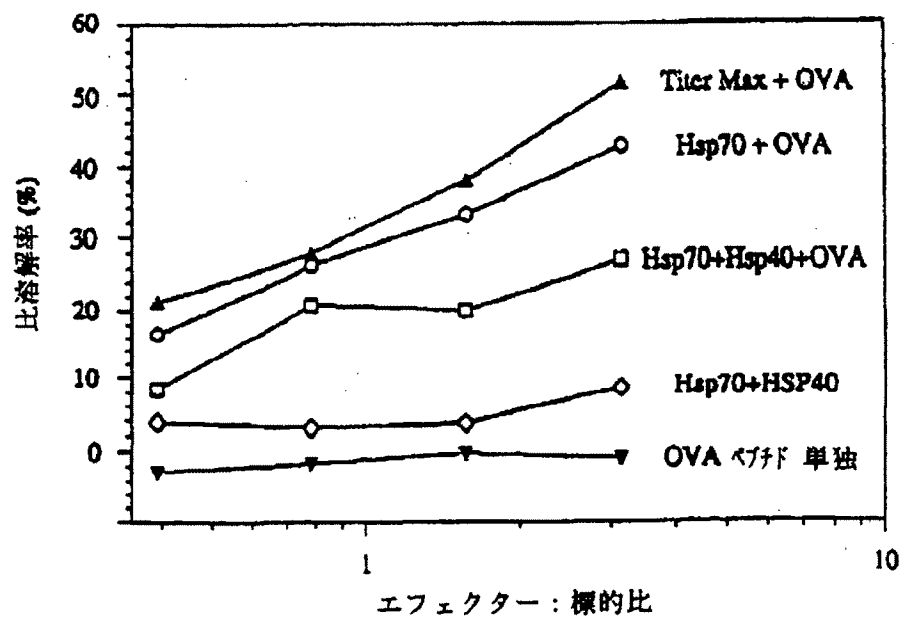


Fig. 9

【手続補正書】

【提出日】1999年1月8日(1999. 1. 8)

【補正内容】

明細書34頁22行に記載の(x i)配列を、

G l n Lys Arg Ala Ala

5

から

Arg Arg Arg Ala Ala

5

に補正します。

【手続補正書】

【提出日】1999年11月12日(1999. 11. 12)

【補正内容】

明細書33頁9行に記載の(A)配列の長さを、9から8に補正します。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/13363

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : A61K 39/00, 39/38; C12P 21/04; C07H 21/02, 21/04

US CL : 424/184.1, 192.1; 435/69.7; 536/23.1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 424/184.1, 192.1; 435/69.7; 536/23.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Extra Sheet.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DENAGEL et al. Heat Shock Proteins in Immune Responses. Critical Reviews in Immunology. 1993, Vol. 13, No. 1, pages 71-81, see entire document.	1-15, 21-24, 28-34
Y	RETZLAFF et al. Bacterial Heat Shock Proteins Directly Induce Cytokine mRNA and Interleukin-1 Secretion in Macrophage Cultures. Infection and Immunity. 1994, Vol. 62, No. 12, pages 5689-5693, see entire document.	1-15, 21-24, 28-34

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Specified categories of cited documents:	* T	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
* A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	* X*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
* E* earlier document published on or after the international filing date	* Y*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
* L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another document or other special reason (as specified)	* A*	document member of the same patent family
* O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
* P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search

14 OCTOBER 1996

Date of mailing of the international search report

13 NOV 1996

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

HEATHER BAKALYAR

Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/13363

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MUSTAFA et al. Human T Cells Recognize Mycobacterial Heat Shock Proteins in the Context of Multiple HLA-DR Molecules: Studies with Healthy Subjects Vaccinated with Mycobacterium Bovis BCG and Mycobacterium leprae. Infection and Immunity. December 1993, Vol. 61, No. 12, pages 5294-5301, see entire document.	1-15, 21-24, 28-34
Y	MULTHOFF et al. A stress-inducible 72-kDa Heat-Shock Protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. Int. J. Cancer. 1995, Vol. 61, pages 272-279, see entire document.	1-15, 21-24, 28-34
Y	YAMAMOTO et al. Listeria monocytogenes-induced gamma interferon secretion by intestinal intraepithelial gamma/delta T lymphocytes. Infection and Immunity. May 1993, Vol. 16, No. 5, pages 2154-2181, see entire document.	1-15, 21-24, 28-34

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet)(July 1992)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/13363

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 16-19, 20, 25-27
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/13363

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

DIALOG author and word: (heat shock protein, hsp, antigen, immunogen, immune, immunity, modulate?, increase? effect, target, neoplas?, gene(w)therapy, etc.)

medline, biosis, scisearch, embase, wpi, uspatful

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターマコード ⁷ (参考)
C 0 7 K 14/47		C 0 7 K 19/00	
19/00		C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02		A 6 1 K 37/02	
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, S Z, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, I L, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, R U, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN		
(72)発明者	ハートル, エフ. アルリッチ アメリカ合衆国 10533 ニューヨーク州 アーヴィントン, クアリー レーン 20		
(72)発明者	ホー, ミー エイチ, アメリカ合衆国 10021 ニューヨーク州 ニューヨーク, イースト 66ティーエイ チ ストリート 312		
(72)発明者	ホートン, アラン アメリカ合衆国 10021 ニューヨーク州 ニューヨーク, イースト 64ティーエイ チ ストリート 402, アpartment 7シー		
(72)発明者	武市 佳純 アメリカ合衆国 10021 ニューヨーク州 ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1635 アpartment 24エム		
(72)発明者	メイヒュー, マーク アメリカ合衆国 10044 ニューヨーク州 ニューヨーク, リバー ロード 10 ア partment 16エイ		